

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN ABBAU
VON MARKIERTEM LECITHIN
IN HUMANSERUM

Reiner Scherer

München 1973

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München
Direktor: Prof. Dr. A. Butenandt

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN ABBAU VON MARKIERTEM LECITHIN
IN HUMANSERUM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades in der Humanmedizin
verfaßt und der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Reiner Scherer

München 1973



1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Butenandt

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5.6.1973

Die vorliegende Doktorarbeit wurde von September 1969 bis Februar 1972 am Max-Planck-Institut für Biochemie in München durchgeführt.

Herrn Professor Dr. A. Butenandt und Herrn Professor Dr. G. Ruhenstroth-Bauer danke ich für die vielseitige Förderung und Unterstützung der Arbeit.

Inhaltsübersicht

	Seite
A. Einleitung	1
B. Material und Geräte	4
C. Methoden	6
D. Ergebnisse	23
E. Besprechung	66
F. Zusammenfassung	83
G. Literaturverzeichnis	85

A. E I N L E I T U N G

Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit waren folgende experimentellen Befunde:

- 1) Die Inkubation von menschlichem Serum oder Plasma in vitro bei 37° führt zu umschriebenen Veränderungen in der Zusammensetzung der Serumlipide: die Cholesterinesterfraktion nimmt auf Kosten des unveresterten Cholesterins zu, der Lecithingehalt sinkt, die Konzentrationen von Lysolecithin und freien Fettsäuren steigen (1-11).

Diese Veränderungen sind bedingt durch die bei 37° aktiven enzymatischen Prozesse des im Serum ablaufenden lipidmetabolismus und die Störung des Fließgleichgewichtes durch Isolierung des Serumkompartments.

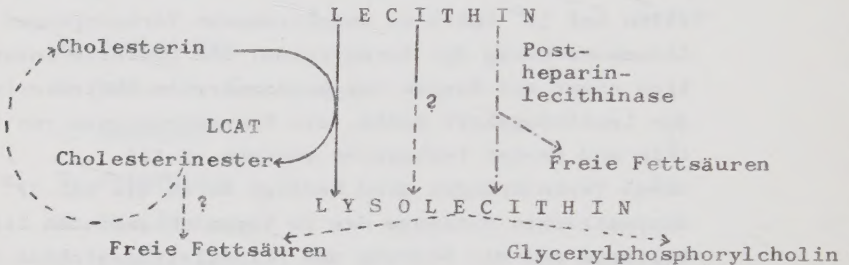
- 2) Menschliches Blutplasma oder Serum, das eine beschleunigte Blutkörperchensenkung verursacht, verliert nach mehrstündiger Inkubation bei 37° die Eigenschaft, eine hohe Senkungsgeschwindigkeit hervorzurufen. Dies gilt sowohl für pathologisches als auch für Serum oder Plasma von Gesunden, das künstlich beschleunigt senkend gemacht wurde. (12-16)

Experimentell konnten für das Lysolecithin und für die unveresterten Fettsäuren aus Humanserum senkungshemmende Eigenschaften nachgewiesen werden (17). Doch erreicht allein das Lysolecithin bereits nach mehrstündiger Inkubation bei 37° die zur Senkungshemmung führende Konzentration. (17)

Die senkungshemmende Wirkung des Lysolecithins ist Folge der membrantoxischen Eigenschaften dieser Substanz: abhängig von der Konzentration des Lysolecithins wird die Erythrozytenmembran in einer Weise verändert, daß die roten Blutkörperchen von der bikonkaven in eine Stechapfel- oder Kugelform übergehen und damit die zur beschleunigten Senkung notwendige Fähigkeit verlieren, (17-19) unter dem Einfluß bestimmter pathologisch ver-

mehrter Serumproteinfractionen Agglomerate zu bilden (17-19).

Bei der vorliegenden Arbeit diente folgende Vorstellung vom Lecithin-Lysolecithin-Metabolismus im isolierten Humanserum als Arbeitsmodell:



Ziel dieser Untersuchung war es, die biochemischen Faktoren zu charakterisieren, die zu einer Erhöhung des Lysolecithinspiegels im Serum bei Wärmeinkubation führen:

- a) Durch Erstellen einer Fettsäurebilanz des Lecithinabbaus mit Hilfe von radioaktiv markiertem Lecithin sollte geklärt werden, ob neben der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) und der nur im Postheparinserum aktiven Postheparinlecithinase noch weitere lecithinabbauende Aktivitäten im Serum nachweisbar sind.
- b) Die Substrat- insbesondere die Fettsäurespezifität des Lecithinabbaus sollte durch Vergleich des Abbaus von endogenem Lipoproteinlecithin und von zugesetztem, markierten Sojabohnenlecithin untersucht werden.
- c) Der Lecithinabbau im Serum von klinisch gesunden Blutspendern sollte quantitativ mit dem Lecithinabbau im Serum von Patienten verschiedener Krankheitsgruppen verglichen werden. Parallel dazu sollte im Blutplasma der Kranken die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit und die Hemmung der Blutkörperchensenkung durch Wärmeinkubation bestimmt werden. Aus dem Vergleich der Ergebnisse von biochemischem Test und Senkungshemmung sollten Informationen gewonnen

werden über die insbesondere für die Tumordiagnostik umstrittene diagnostische Aussagekraft des Senkungshemmungstests in der medizinischen Praxis.

B. MATERIAL UND GERÄTE

1) Reagenzien

- Aceton, Alkohol, Äther:pa , Merck AG (Darmstadt)
Amidoschwarz 10 B (für Elektrophorese): Merck AG (Darmstadt)
1-Amino-2-hydroxynaphthalinsulfonsäure zur Phosphorbestimmung: Merck AG (Darmstadt)
Ammoniak 25 %: Riedel-De-Haen AG (Seelze-Hannover)
Ammoniumheptamolybdat pa : Merck AG (Darmstadt)
Chloroform, Methanol pa: Merck AG (Darmstadt)
Cialit: Asid-Institut GmbH (München-Lohhof)
DC-Fertigplatten Kieselgel o. Fluoreszenzinidikator :Merck AG (Darmstadt)
Dinatriumphenylphosphat pa: Merck AG (Darmstadt)
EDTA-Dinatriumsalz: Merck AG (Darmstadt)
Essigsäure pa: Merck AG (Darmstadt)
Hexan 60°-70° pa: Merck AG (Darmstadt)
p-Hydroxymercuribenzoat (Natriumsalz) : Sigma (St.Louis, USA)
Kaliumbromid pa: Merck AG (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (Sörensen): Riedel-De-Haen AG (Seelze-Hannover)
Kieselsäure, getrocknet, gefällt: Merck AG (Darmstadt)
Kupfernitrat pa: Merck AG (Darmstadt)
Lecithin: Mann Research Laboratories, Inc. (New York, USA)
Lysolecithin rein: Nutritional Biochemical Corporation
NaCl, NaHCO₃ pa: Merck AG (Darmstadt)
Natriumkarbonat pa: Merck AG (Darmstadt)
Natriumpyrosulfit chem. rein: Riedel-De-Haen AG (Hannover)
Palmitinsäure reinst: Henckel u. Cie GmbH (Düsseldorf)
Ölsäure reinst: Merck AG (Darmstadt)
Perchlorsäure pa: Merck AG (Darmstadt)
Petroläther 60°-70° rein: Schell AG (Frankfurt)
³²P -o-Phosphat: Radiochemical Centre (Amersham, England)
Phosphorsäure 85%-ige Lösung: Merck AG (Darmstadt)
SAM: Seifenfabrik Dr. Schnell (München)
Röntgenfilm Osray DW: Agfa-Gevaert (München)
Toluol pa: Merck AG (Darmstadt)

Tritium-Acetat (Na-Salz) The Radiochemical Centre:
(Amersham, England)
Triton X 100: Serva (Heidelberg)

2) Geräte

Christ -Ultrazentrifuge Omega II (Osterode/Harz)
Flüssigkeitsszintillationszähler Inter technique SL 20
(Paris, France)
Gefriertrocknungsanlage WKF-L2 Brandau (Darmstadt)
Densitometer, Joyce/Loeble (Gateshead-on-Tyne, England)
Immunelektrophorese-Apparatur (UGI-System): Desaga GmbH
(München)
Osmometer: Knauer (Berlin)
Köttermann-Schüttelinkubator (München)
Microdoser, Desaga (Heidelberg)
Microliterspritze 100 ul Hamilton (Bonaduz, Schweiz)
Mixer MX-32, Braun (München)
MSE-Zentrifuge (High speed, 18): MSE (London, England)
LKB-Fraktionssammler Ultrarac 7000 LKB-Produkte (Stockholm,
Schweden)
Ti-50-Rotor, Ti-70-Rotor, Beckman (München)
Rotationsverdampfer Rotavapro; Büchi (Flawil, Schweiz)
Sonifier S75 Branson (Connecticut, USA)
Spektralphotometer DU: Beckman (München)
Spektralphotometer DB: Beckman (München)
Ultrazentrifuge L/L2 Spinco: Beckman (München)
Vertical-Gel-Elektrophorese, E-C Apparatus Corp. (Philadelphia, USA)

C. M E T H O D E N

1) Herstellung von radioaktiv markiertem Sojabohnenlecithin

a) Einbau von Phosphor-32 und Tritium in die Sojabohnenphosphatide

Unter Ausnutzung der starken Stoffwechselaktivität der Sojabohnen während der Keimphase (20) wurden den Bohnen markierte Bausteine des Phosphatidstoffwechsels angeboten, um über den Weg der Biosynthese zu ^{32}P - ^3H -doppelmarkiertem Lecithin hoher spezifischer Aktivität zu gelangen:

Daten zur Sojabohneninkubation

Ausgangsmenge	25 g Sojabohnen, neue Ernte
Phosphor-32	0,5 mCi als o-Phosphat in verdünnter HCl (pH 2-3)
Tritium	1 mCi als Na-Acetat in 0,9 %NaCl spez. Aktivität: 5,5 mCi/mMol Acetat
Inkubationsdauer	35 Stunden
Temperatur	37° (Inkubationsschrank)

Phosphat und Acetat wurden in konzentrierter Form (5 ml Gesamtflüssigkeitsvolumen) den Sojabohnen am Boden eines 1l-Erlenmeyergefäßes zugegeben und von diesen durch Quellung innerhalb einer Stunde bei Zimmertemperatur aufgenommen. Nach Zugabe von 15 ml Leitungswasser erfolgte die Inkubation in einem Wärmeschrank, wobei für eine weitere gleichmäßige Befeuchtung der keimenden Bohnen gesorgt wurde.

b) Extraktion der Sojabohnenlipide

Die gekeimten Bohnen wurden unter Hinzufügen von 250 ml Aqua dest. mit einem Braun-Mixgerät homogenisiert und anschließend friertrocknet. Das Lyophilisat wurde, um den Großteil der Neutrallipide zu entfernen, einer dreimaligen Extraktion mit jeweils 300 ml Aceton unterworfen. Zur Gewinnung der restlichen Lipide, insbesondere der Phospholipide, wurde das Bohnenhomogenat zusammen mit 250 ml

Chloroform-Methanol (2:1) eine Stunde bei Zimmertemperatur gerührt und dann die flüssige lipidhaltige Phase durch Saugfiltration gewonnen. Dieser Extraktionsschritt wurde in gleicher Weise zwei weitere Male durchgeführt. Die vereinigte Chloroform-Methanol-Phase wurde durch Rotationsverdampfung bis auf den hochviskösen Lipidrückstand eingengt. Zur Entfernung der wasserlöslichen Verbindungen (insbesondere von Spuren markierten Phosphats und Acetats), wurde dieser Rückstand in 200 ml Chloroform aufgelöst und in einem Scheidetrichter ca. 20 ml Wasser hinzugegeben; nach dem Umschütteln und der anschließenden Phasentrennung wurde die untere Phase als Lipidohextrakt (Abb.1a) gewonnen und der Rotationsverdampfung unterworfen.

c) Isolierung des ^3H - ^{32}P -Lecithins

Zur Entfernung des ebenfalls hoch markierten Colamin-Cephalin wurde der Lipidohextrakt in 15 ml Chloroform-Methanol (1:1) aufgelöst, auf eine Aluminiumoxydsäule nach RHODES u. LEA (21) aufgetragen (Säulenhöhe 8 cm, ϕ 2 cm) und mit 300 ml Chloroform-Methanol (1:1) eluiert (Abb. 1 b)

Das verbleibende Lipidgemisch wurde dann an einer Silicium-Oxyd-Silikatsäule nach ROUSER et al (22) weiter fraktioniert. Präparation der Säule: 50 g Kieselsäure wurden in Chloroform-Methanol (1:1) aufgeschwemmt, mit 7 ml 25%igen wässrigen Ammoniak gemischt, in eine Säule (ϕ 1,8 cm) gefüllt bis zu einer Säulenhöhe von 15 cm nach dem Absetzen und mit 350 ml Chloroform gewaschen, um Methanol und Wasser zu entfernen.

Das Lipidgemisch wurde, gelöst in 15 ml Chloroform, auf die Säule aufgetragen und die Fettsäuren und Neutrallipide mit 300 ml Chloroform eluiert (Abb. 1 c). Das auf der Säule zurückgehaltene polare Lecithin wurde mit einer Mischung Chloroform-Methanol-Wasser (80:20:1,5) (Eluationsvolumen 300 ml) abgewaschen (Abb. 1d) und das Eluat in einem Spitzkolben bis zur Trockenheit rotationsverdampft.

Für die Inkubation mit Serum wurde das Lecithin in Phosphatpuffer (0,02 molar, pH 7,4) suspendiert und bis zur

Opaleszenz ultrabeschallt (Branson Sonifier S75, Stufe II, 2 Minuten Beschallungsdauer).

Die einzelnen Schritte der Gewinnung des Lecithins wurden über Radiodünnschichtchromatographie verfolgt (Abb. 1a-d):

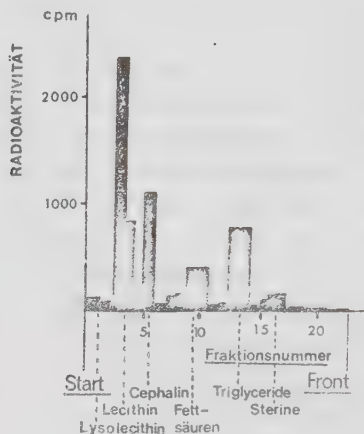


Abb.1a Rohextrakt der Sojabohnenlipide

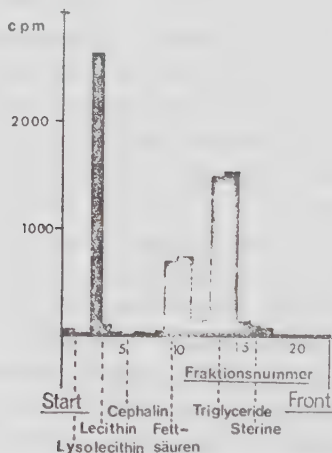


Abb.1b Sojabohnenlipidextrakt nach Reinigung an der Al_2O_3 -Säule

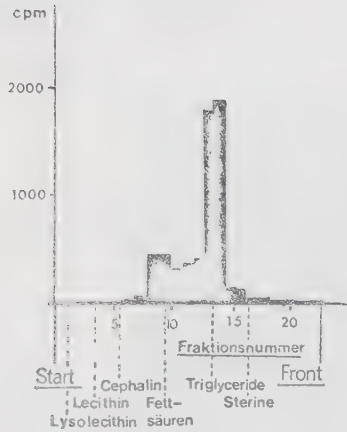


Abb. 1c

Chloroformeluat von der Siliciumoxyl-Silicatsäule

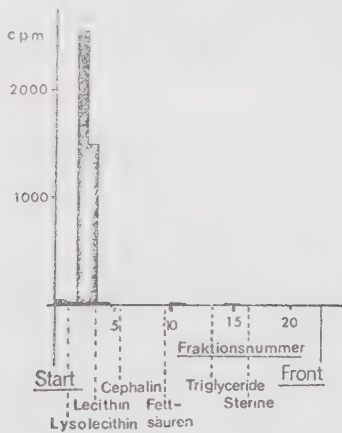


Abb. 1d

Chloroform-Methanol-H₂O-Eluat von der Silicium-Oxyd-Silicat-Säule

Daten zur Lecithinpräparation aus Sojabohnen

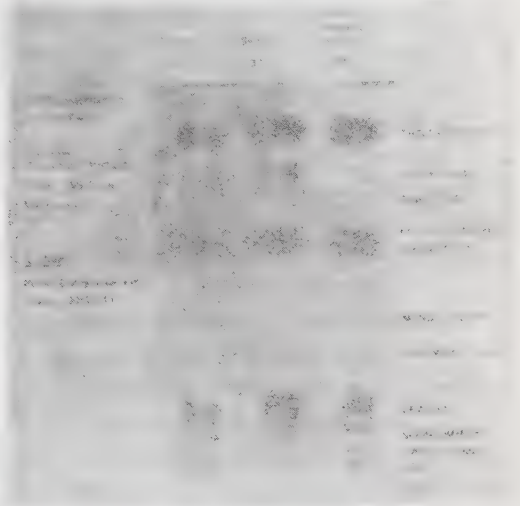
Gesamtmenge des gewonnenen Lecithins	68,5 mg Lecithin
	25 g Sojabohnen
Ausbeute in % vom Chloroform-Meth.- Rohextrakt	78 %
Verluste	
bei der Phasentrennung	7 %
auf der Al_2O_3 -Säule	13 %
auf der Siliciumoxyd-Silikatsäule	2 %
spezifische Aktivität des Lecithins:	
Phosphor-32	72000 dpm/ μ Mol Lecith
Tritium	472000 dpm/ μ Mol Lecith
spezifische Aktivität des Lysolecithins, gemessen nach enzymatischer Hydrolyse des Lecithins durch Bienengiftphospholipase A2:	
Tritium	241000 dpm/ μ Mol Lysol
mittlere spez. Aktivität der hydro- lysierten Fettsäure aus A1-Position:	
Tritium	231000 dpm/ μ Mol Fetts
radiochemische Reinheit des Lecithins	99,5 %
Verunreinigungen:	
Lysolecithin	2,5 %
Triglyceride, Fettsäuren	1 %
prozentualer Radioaktivitätseinbau in das gewonnene Lecithin, bezogen auf die gesamte eingesetzte Radiaktivität	
^{32}P - o-Phosphat	0,57 % eingebaut
3H - Na-Acetat	1,84 % "

2) Dünnschichtchromatographie der Serumlipide

Um Fettsäuretransfer und -freisetzung beim Lecithinabbau im Serum optimal im Rahmen einer Fettsäurebilanz erfassen zu können, wurde nach einem Dünnschichtchromatographiesystem gesucht, das es ermöglichen sollte, Lecithin, Lysolecithin, freie

Fettsäuren und Cholesterinester zu trennen. Damit sollten die zur Bilanz erforderlichen Komponenten alle gemeinsam aus einem Ansatz mit der für alle gleichen Lipidextraktion erfaßt werden.

Abb. 2: Serumlipid-
dünnschichtchroma-
tographie



Da es nicht möglich war, sowohl polare als auch unpolare Lipide mit einer Laufmittelzusammenstellung in einem einzigen Lauf zu trennen, wurde eine Zwei-Stufen-Chromatographie entwickelt: Im ersten Lauf wurden die Serumphospholipide nach einer Laufmittelzusammenstellung (Chloroform/Methanol/Wasser 56:24:4) von ZÄHLER (23) getrennt, wobei jedoch die Laufhöhe auf 13 cm beschränkt wurde. Die unpolaren Lipide wandern bei diesem Lauf mit der Front des Laufmittels. Nach der ersten Trennstufe wurde die Dünnschichtplatte 40 min bei Raumtemperatur getrocknet und dann ein zweiter Lauf in gleicher Richtung über die volle Plattenlänge (20 cm) mit Hexan/Diäthyläther/Eisessig (80:20:1,2) als Laufmittel durchgeführt. Bei dieser Laufmittelzusammenstellung bleiben die Phospholipide fest am Kieselgel adsorbiert, während die übrigen Serumlipide in eine Cholesterin-, Fettsäure-,

Triglycerid- und Cholesterinesterfraktion aufgetrennt werden. Die Lipide wurden durch Jodbedampfung lokalisiert und durch Testläufe mit Referenzsubstanzen indentifiziert.

Rf-Werte der Lipiddünnschichtchromatographie

Lysolecithin	0,07
Sphingomyelin	0,10
Lecithin	0,17
Colamin-Cephalin	0,31
Cholesterin	0,59
Freie Fettsäuren	0,62
Triglyceride	0,79
Cholesterinester	0,86

4) Radiodünnschichtchromatographie

Zur Erstellung von Radiochromatogrammen wurden Dünnschichtchromatogramme radioaktiv markierter Lipide in gleiche Fraktionen unterteilt, in Scintillationsfläschchen überführt und die Radioaktivität bestimmt.

5) Bestimmung der Radioaktivität

Die Messung der Radioaktivität erfolgte mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler Intertechnique SL 20.

Die durch Jodanfärbung auf der Dünnschichtplatte lokalisierten Lipidfraktionen wurden nach weitgehendem Abdampfen des Jods mit Hilfe eines in die Öffnung des Szintillationsfläschchens eingepaßten, mit einer Wasserstrahlpumpe verbundenen Absaugstutzens, mit dem Kieselgel direkt in das Zählfläschchen überführt und so Verluste durch zusätzliche Manipulationen beim Abschaben des Kieselgels vermieden.

Für die Radioaktivitätsbestimmung von Cholesterinestern und Fettsäuren wurden gleiche Zählmedien verwendet, z. B. PPO/1000 mg Toluol bei einem Scintillatorvolumen von 10 ml/Zählglas. Die Cholesterinester werden in diesem Scintillationsmedium vollständig vom Kieselgel desorbiert, das gleiche gilt für die Fettsäuren, da das verwendete Dünnschicht-Laufmittel Eisessig enthält (24). Das Kieselgel und eine mäßige Rest-

jodanfärbung verursachen nach SNYDER (25) keine Verminderung der Zählausbeute. Daß tatsächlich für alle Proben untereinander identische Quenchbedingungen vorlagen, zeigte sich am konstanten Kanalverhältnis der Messungen in den Kanälen für den externen Standard, die bei jeder Probemessung mit ausgedruckt wurden. Wegen der für alle Proben gleichen Quenchbedingungen war eine zusätzliche Quenchkorrektur nicht notwendig und die Radioaktivitätsbestimmungen konnten als Relativmessungen durchgeführt werden. Die Bestimmung der absoluten Radioaktivität war nur für die Erstellung der Fettsäurebilanz des Lecithinabbaus erforderlich, da Lecithin und Lysolecithin in einem anderen Szintillationsmedium mit einer anderen Zählausbeute als Cholesterinester und Fettsäuren gezählt wurden.

Lecithin und Lysolecithin von Kieselgeldünnschichtplatten werden in PPO-Toluol-Medien vor allem bei der ^3H -Messung nur mit niedriger Zählausbeute und schlecht reproduzierbaren Ergebnissen gezählt. Die Phospholipide bleiben im Toluolmedium am Kieselgel adsorbiert und sinken mit diesem auf den Boden des Zählröhrchens, was zu unkontrollierbarer Selbstabsorption führt. Von uns unternommene Versuche, stabile Kieselgelsuspensionen im Zählröhrchen durch Cab-O-Sil-Zusatz (25) herzustellen, wurden wegen der inkonstanten Zählausbeute durch die unterschiedliche Kieselgelpartikelgröße wieder verlassen.

Einer verlässlichen radioaktiven Lecithin- und Lysolecithinbestimmung dienten in den vorliegenden Untersuchungen folgende Maßnahmen:

- a) Die Phospholipide wurden doppelmarkiert. Da für das energiereichere Phosphor-32 die Selbstabsorption nur von untergeordneter Bedeutung ist, konnte die Tritiumzählung stets durch die gleichzeitige Phosporzählung kontrolliert und korrigiert werden.
- b) Es wurde ein Scintillator (11 ml Toluol + 0,5 % PPO, 2 ml Methanol, 2 ml Triton X-100, 0,2 ml H_2O) zusammengestellt,

der bei relativ hoher Tritiumzählausbeute die Phospholipide fast vollständig vom Kieselgel desorbiert, so daß sich über 95 % der Radioaktivität im Überstand des Zählröhrchens befand. Dadurch waren bei der Tritiumzählung Zählausbeuteverluste von maximal 2 % möglich, während sie für die energiereichere Phosphor-32-Strahlung völlig zu vernachlässigen waren.

Zur Zählung der doppelt markierten Verbindungen wurde die fixe Kanalvorwahl-einstellung für $^3\text{H}/^{32}\text{P}$ -Doppelmarkierungen des Zählgerätes benutzt.

Zählausbeuten bei der Radioaktivitätsmessung:

	^3H -Kanal	^{32}P -Kanal
1) Scintillationsmedium (Toluol + 0,5 % PPO)		
a) Tritium	49 %	0 %
b) Phosphor-32	3,5 %	89,5 %
2) Scintillationsmedium (11 ml Toluol + 0,5 % PPO, 2 ml Methanol, 2 ml Triton X-100, 0,2 ml H_2O)		
a) Tritium	36,5 %	0 %
b) Phosphor-32	5 %	87 %

6) Extraktion der Serumlipide

Die Extraktion der Serumlipide wurde nach einem modifizierten Verfahren von HABERMANN et al (26) durchgeführt. Die Serumtestansätze wurden friergetrocknet und die Trockensubstanz in 7 ml Methanol suspendiert. Anschließend wurden 7 ml Chloroform hinzugegeben, mit dem Whirlmixer ca. 15 sec durchmischt und im Wasserbad bei 30° unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Nach der Zugabe von weiteren 7 ml Chloroform wurde die Oberphase über ein Filter in ein Schliffzentrifugenglas dekantiert, das Sediment erneut mit 10 ml Chloroform-Methanol (2:1) aufgeschwemmt und in das Schliffzentrifugenglas filtriert. Der Lipidextrakt wurde im Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht und in 5 ml Chloroform erneut gelöst.

Dazu wurden 5 ml Petroläther (63^o-67^o) gegeben. Nach ausgiebiger Durchmischung wurde der Niederschlag abzentrifugiert (3000 U/min, 5min). Der Überstand wurde in ein weiteres Schliffzentrifugenglas dekantiert. Mit 10 ml Chloroform-Petroläther (1:1) wurde nachgewaschen, erneut zentrifugiert und dekantiert. Durch Rotationsverdampfung wurde der Serumlipidextrakt getrocknet. Zum Auftragen auf die Dünnschichtplatte wurde der Lipidfilm an der Innenwand des Schliffzentrifugenglases in 1 ml Chloroform-Metanol (65:25) gelöst, davon 100 μ l in eine 100 μ l Hamilton-Spritze aufgezogen und mit einem halbautomatischen Dünnschichtauftragegerät mit elektromechanischem Spritzenvor-schub bandförmig (Bandbreite 2 cm) auf die Dünnschichtplatte aufgetragen.

7) Phosphorbestimmung

a) Reinigung der Glaswaren

Die bei der Phosphorbestimmung verwendeten Glaswaren wurden nach der Vorreinigung mit Leitungswasser mindestens 8 Stunden in Chromschwefelsäure gehalten. Danach wurden sie 24 Stunden in fließendem Leitungswasser gewässert, zweimal mit aqua dest. und zweimal mit aqua bidest. gespült und bei 200^o getrocknet.

b) Veraschung nach Bartlett (27)

Das Kieselgel aus den angezeichneten Banden der Dünnschichtchromatographie wurde in Schliffröhrchen überführt, die 0,4 ml 70%-ige Perchlorsäure enthielten. Nach Zugabe von weiteren 0,3 ml Perchlorsäure und Durchmischung mit dem Whirlmixer erfolgte die Veraschung im Aluminiumblock bei 180^o während 45 Minuten.

c) Farbentwicklung und Messung

Nach dem Abkühlen der Röhrchen wurden 4,6 ml einer 0,22%-igen Ammoniumolybdatlösung sowie 0,2 ml Fiske-SubbaRow-Reagenz zugegeben und gemischt. Die Farbentwicklung erfolgte während der 10-minütigen Erhitzung im Wasserbad nahe der Siedetemperatur. Bei der unmittelbar anschließenden Zentrifugation (3000 UpM 5 min) setzte sich das Kieselgel am Boden des Röhrchens ab, die Extinktion des Überstandes wurde in einem Beckman-Spektralphotometer DU bei 830nm gegen einen phosphorfreien

Leerwert gemessen: Als Kontrollwerte dienten Proben, die phospholipidfreies Kieselgel aus den gleichen Dünnschichtplatten enthielten. Zur Quantifizierung des Phosphorgehaltes wurde die Extinktion von drei Eichwerten bestimmt, die 2 µg Phosphat (= 0,5 ml einer Standardlösung von Dinatriumphenylphosphat = 16,407 µg Dinatriumphenylphosphat) enthielten. Für die Berechnung der Phospholipide wurde dem Lysolecithin ein Phosphorgehalt von 5,96 Gewichtsprozent und dem Lecithin von 3,9 Gewichtsprozent zugrunde gelegt.

d) Herstellung des Fiske-Subbarow-Reagenz (28)

6,85 Natriumhyposulfit oder 7,5 g Natriumbisulfit werden in 50 ml Wasser gelöst und 0,125 g Aminoaphtosulfonsäure hinzugegeben. Nach kräftigem Schütteln wird unter Rühren eine frisch zubereitete 30 %-ige (g/v) Natriumsulfitlösung solange zugetropft, bis die Trübung verschwindet. Das Reagenz wurde im Dunkeln aufbewahrt und längstens innerhalb von 14 Tagen verwendet.

8) Bestimmung der unveresterten Fettsäuren

Die Bestimmung der freien Fettsäuren wurde nach dem von DUNCOMBE (29) und HOWORTH et al (30) angegebenen Verfahren durchgeführt:

a) Reagenzien

Lösung 1: 0,27 M Kupfernitrat, 0,45 M Triäthanolaminpuffer
pH 7,8

Lösung 2: 9mM Diäthylthiocarbaminat

b) Bestimmung

In ein Schliffzentrifugenglas wurden zu 0,2 ml der Serumprobe 5 ml Chloroform sowie 1 ml der Lösung 1 gegeben. Die mit fixierten Schliffstopfen versehenen Zentrifugengläser wurden 10 Minuten geschüttelt und dann 5 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert. Die wässrige Oberphase einschließlich der Proteinschicht wurde mit einer an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossenen spitz ausgezogenen Pipette abgesaugt. Von der Chloroformphase wurden 2 ml in ein Zentrifugenglas pipettiert und mit 0,2 ml der Lösung 2 vermischt. Nach 10 min wurde die Extinktion bei 440nm von Probe, Eich-

standard (= 0,5 mVal unveresterte Fettsäuren/1) und Leerwert gemessen:

$$\frac{\text{Ext. (Probe)}}{\text{Ext. (Standard)}} \times 0,5 = \text{mVal unveresterte Fettsäuren/1 Testserum}$$

9) Präparative Darstellung von Gesamtlipoprotein und von Lipoproteinunterklassen durch Ultrazentrifugation.

Die präparative Darstellung der Serumlipoproteine erfolgte durch Ultrazentrifugation bei erhöhter Dichte nach Methoden von DE LALLA, GOFMAN und NICHOLS (31-33). Die Dichte des Nativserums wurde mit 1,006 g/ml angesetzt (33), was der allein durch die niedermolekularen Substanzen des Serums verursachten Dichte entspricht. Für die Berechnung der für eine bestimmte Dichteeinstellung notwendigen Menge an festem KBr wurde nach der von HAVEL et al (37) angegebenen Formel vorgegangen:

$$A = \frac{100 (X - Y)}{Z - X}$$

A = Volumen einer 50 %-igen Kaliumbromid-Modelllösung
(d = 1,3457 g/ml)

X = Dichte, auf die das Serum eingestellt werden soll

Y = angenommene Dichte des Serums (= 1,006 g/ml)

Z = Dichte der Kaliumbromid-Modelllösung (= 1,3457 g/ml)

Mit Hilfe der Formel wird das Volumen einer 50 %-igen Kaliumbromidlösung der Dichte 1,3457 g/ml errechnet, das notwendig ist, um 100 ml des Ausgangsserums auf die gewünschte Dichte X einzustellen.

Beispiel:

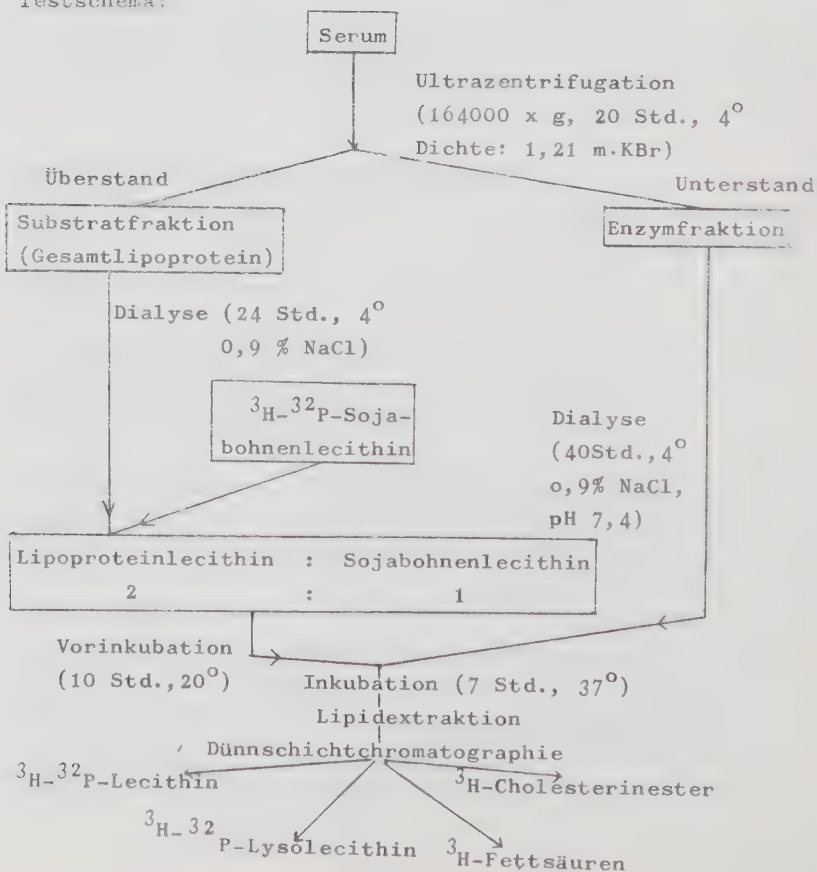
Berechnung der KBr-Menge, die zur Einstellung der Dichte d = 1,019 für die Isolierung von Very-Low-Density-Lipoproteinen notwendig war:

$$A = \frac{100 (1,019 - 1,006)}{1,3457 - 1,019} = 3,979 \text{ ml}$$

Zu 100 ml Serum muß man 3,979 ml der 50 %-igen KBr-Lösung geben. Diese enthalten 1,99 g Kaliumbromid, dadurch erhöht sich aber das Volumen auf 103,979 ml. Rechnet man zurück auf ein Serumvolumen von 100 ml, so ergibt sich eine Gewichtsmenge von 1,914 g festem KBr, die man in 100 ml auflösen muß. Für die Darstellung der Gesamtlipoproteine wurde das Serum auf eine Dichte von 1,21 g/ml eingestellt. Die Dauer der einzelnen Zentrifugationsschritte betrug jeweils 20 Stunden bei 50000 UpM, was einem mittleren Schwerefeld von 164000 x g entspricht.

10) Test zur Erfassung des Lecithin- und Lysolecithinabbaus in normalen und pathologischen Seren.

Testschema:



Der Test ist charakterisiert durch die Auftrennung der Präparationsgänge von Enzym- und Substratfraktion. Diese Auftrennung war notwendig:

- a) Um eine gleichmäßige radioaktive Markierung des Substratlipoproteins zu erreichen.
- b) Um geschlechts- und altersbedingte (34,35) sowie durch pathologische Zustände (36) verursachte Konzentrationsunterschiede der Substratlipoproteine in nicht ultrazentri-fugierten Seren als zweite Variable neben den zu untersuchen-
den unterschiedlichen Enzymaktivitäten auszuschalten.
- c) Um durch eine standardisierte Substratzusammensetzung die Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit des Enzymtestes zu schaffen.

Für die Untersuchung der individualspezifischen Enzymaktivitäten beim Lecithinabbau wurde von einem Volumen von 5 ml Serum je Proband ausgegangen. In jedem Serum wurde die auf ein Gesamtvolumen von 14 ml berechnete Menge KBr zur Einstellung einer Dichte von 1,21 aufgelöst, mit 0,9 % NaCl pH 7,4 auf 14 ml aufgefüllt und die verschiedenen Seren in je ein Ultrazentrifugenröhrchen gefüllt. Die Serumverdünnung diente dazu, die zum Test benötigte Blutmenge insbesondere in Hinblick auf die Untersuchung von Patienten- und Kinderseren möglichst niedrig zu halten und trotzdem eine effektive und reproduzierbare Auftrennung von Enzym- und Substratfraktion durch die Ultrazentrifugation zu erreichen.

Diese Trennung wurde durch 20-stündige Ultrazentrifugation bei 4° und einem mittleren Schwerefeld von 164000x g in dem für den Test zu fordernden Maß durchgeführt. Von dem Lipoproteinüberstand wurden 0,5 ml je Röhrchen mit einer Spritze abgenommen und weitere 1,5 ml der anschließenden Zwischenzone verworfen.

Für die folgende Substratpräparation kam nur das Lipoprotein klinisch gesunder Testpersonen zur Verwendung. Dieses wurde um das KBr zu entfernen, 24 Stunden bei 4° dialysiert, der Lecithingehalt nach Phosphorbestimmung berechnet und ultrabeschalltes markiertes Sojabohnenlecithin hinzugegeben, wobei

das molare Verhältnis von nativem Lipoproteinlecithin zu markiertem Sojalecithin 2:1 betrug. Durch Verdünnung mit 0,9 % NaCl wurde die Substratfraktion auf eine Konzentration von 6 mg Lecithin / ml eingestellt. Nach Zugabe von Cialit (1:10000) wurde das Substrat 10 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Rühren präinkubiert, um eine ausreichende Äquilibrierung von markiertem und unmarkiertem Lecithin am Lipoproteinmolekül zu ermöglichen.

Zur Inkubation wurde je Ansatz 0,5 ml Substrat (= 2 mg Lipoproteinlecithin + 1 mg Sojalecithin) + 3,5 ml der dialysierten Enzymfraktion ausgetestet. Die Kontrollwerte enthielten 0,5 ml der Substratfraktion + 3,5 ml 0,9 % NaCl-Lösung (pH 7,4). Die Inkubation wurde in einem Schüttelinkubator bei 37° durchgeführt.

11) Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Serumelektrophorese wurde als kontinuierliche Polyacrylamidgel-Elektrophorese in einem Vertikal-Gelplatten-Elektrophoresegerät durchgeführt. Da vor allem Serum-High- und Low-Density-Lipoproteine dargestellt werden sollten, wurde ein 3,5 %-iges Polyacrylamidgel verwendet (38).

Die Vertikal-Gelplatten-Elektrophorese wurde aus folgendem Grund gewählt:

Nach MAURER (39) erlaubt sie, mehrere Proben (beim verwendeten Gerätetyp bis zu 16 Proben) gleichzeitig im selben Gel unter völlig identischen Bedingungen laufen zu lassen. Dies war vor allem für Untersuchungen über die Änderung der elektrophoretischen Beweglichkeit der Serumlipoproteine unter dem Einfluß von Wärmeinkubation oder Fettsäurezusatz von Bedeutung.

Reagenzien:

Elektrodenpuffer pH 8,3:

6,0 g Tris
28,8 g Glycin
10 l aqua bidest.

Trenngel:

Lösung A	Acrylamid	14,0 g
	Methyl-bisacrylamid	<u>0,36 g</u>
	aqua bidest.	ad 100 ml
Lösung B	160 mg Ammoniumpersulfat/100 ml H ₂ O	
Lösung C	1 N HCl	48 ml
	Tris	36,6 g
	TEMED	<u>0,23 ml</u>
	aqua bidest.	ad 100 ml

Zur Gelpräparation wurden 1 Teil der Lösung A, 2 Teile von B und 1 Teil von Lösung C vereinigt und die Gelkammer des Gerätes damit beschickt.

Nach erfolgter Polymerisation, Auffüllen des Elektrodenpuffersystems und Inbetriebnahme von Kühl- und Pufferkreislauf wurde noch vor dem Auftragen der Proben ein 30 minütiger Vorlauf bei 300 Volt durchgeführt.

Die mit Sucrose (zur Erhöhung der Dichte) und Bromphenol-Blau (als Marker) versetzten Proben wurden mit einer Eppendorf-Mikroliter-Pipette in die ausgesparten Probengeltaschen eingeführt. Das Probenvolumen betrug 50 μ l.

Die Elektrophorese erfolgte bei 300 V/120mA und wurde bis zu einer Wanderungsweite von ca. 12 cm für die am schnellsten wandernde Komponente durchgeführt.

Die Färbung erfolgt mit Amidoschwarz (0,25 % Amidoschwarz in Methanol/H₂O/Eisessig 5:5:1) Färbezeit 15 Minuten.

Entfärbt und differenziert wurde mit 3,5 %-iger Essigsäure.

12) Autoradiographie

Durch die Zugabe von ³²P-Lecithin zu Serum werden die Lipoproteine selektiv radioaktiv markiert. Dadurch war es möglich von normalen Serumelektrophoresen durch Auflegen eines Röntgenfilms Autoradiographien herzustellen, die aus dem Serumproteinspektrum isoliert nur die markierten Lipoproteine darstellten. Die zonale Schwärzung der Röntgenfilme wurde densitometrisch ausgewertet. Die Kontaktzeit von Röntgenfilm und getrocknetem Elektrophoresegelel betrug je nach Strahlungsintensität 1 bis 3 Wochen.

13) Bestimmung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit und der Hemmung der Blutkörperchensenkung.

a) Blutgewinnung

Citratplasma und Erythrozyten wurden aus venösem Citratblut (3,8 %ige wässrige Natriumcitratlösung : Blut = 1:4) gewonnen. Für die Bestimmung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit wurden stets Erythrozyten der Blutgruppe 0 von klinisch gesunden Spendern verwendet. Nach der Zentrifugation (1880 g, 10 Minuten) wurde das Plasma des 0-Blutes mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt, die Erythrozyten in 0,9 % NaCl Lösung resuspendiert und erneut wie beschrieben zentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die gepackten Erythrozyten dem auszutestenden Plasma zugesetzt.

b) Bestimmung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit

Die Bestimmung der Senkungsgeschwindigkeit der Erythrozyten erfolgte nach der Methode von WESTERGREN (40).

Zu jeweils 1 ml des auf die Senkungsaktivität auszutestenden Plasmas wurden 0,5 ml der gewaschenen und gepackten 0-Erythrozyten gegeben, vorsichtig gemischt und in ein genormtes Senkungsröhrchen aufgezogen.

c) Bestimmung der Hemmung der Blutkörperchensenkung

Die im Plasma nach mehrstündiger Wärmeinkubation auftretende Hemmung der Blutkörperchensenkung wurde bestimmt, indem die 0-Erythrozyten zu Plasma gegeben wurden, das über eine bestimmte Zeit bei 37° inkubiert worden war. Die Hemmung wurde bezogen auf den Senkungswert eines nicht inkubierten Kontrollansatzes desselben Plasmas.

Die Hemmwerte für die inkubierten Senkungsansätze wurden abgelesen, nachdem der Kontrollansatz einen Senkungswert von 50 mm erreicht hatte und in Prozent der Senkungsaktivität dieses Kontrollansatzes ausgedrückt.

II. E R G E B N I S S E

I) Versuche zur Erstellung der Fettsäurebilanz des Lecithinabbaus im Serum

1) Entwicklung der Testmethode

Es wurde geprüft, ob es möglich ist, den bei Inkubation von Serum auftretenden Fettsäuretransfer vom Lecithin zum Cholesterin sowie die Fettsäurefreisetzung durch die Verwendung von radioaktiv markiertem Lecithin in Verbindung mit dem entwickelten Zweistufen-Dünnschichtchromatographiesystem quantitativ zu verfolgen:

Serum wurde mit ultrabeschalltem ^3H - ^{32}P -Fogelbohnenlecithin (1 mg Lec./ml Serum + Cialit 1:10000) versetzt und 10 Stunden bei 37° inkubiert. Die Lipidextrakte des 37° -Ansatzes sowie eines bei 4° gehaltenen Kontrollansatzes wurden in der Zweistufentechnik über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und ein Radiochromatogramm der beiden Testansätze angefertigt:

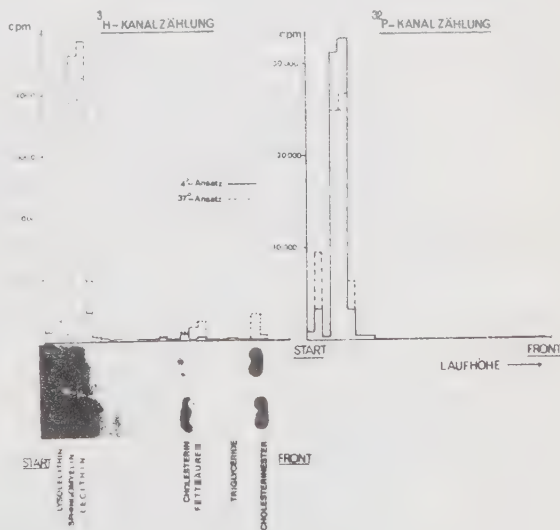


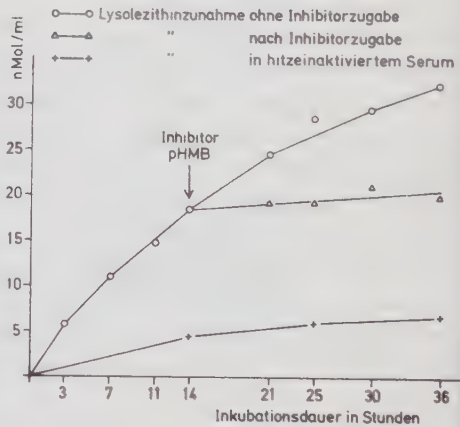
Abb.3: Radiochromatogramm des 4° - u. 37° -Serumtestansatzes

Ergebnis:

- a) Das Sojabohnenlecithin wird im Serum enzymatisch verarbeitet wobei radioaktiv markierte Cholesterinester, Lysolecithin und freie Fettsäuren entstehen.
 - b) Die Umverteilung der Radioaktivität bleibt auf die Lipidfraktionen Lecithin, Lysolecithin, freie Fettsäuren und Cholesterinester beschränkt. Eine nennenswerte Zunahme der Radioaktivität in der Mono-, Di- und Triglyceridfraktion konnte in Übereinstimmung mit Befunden anderer Autoren (41) erst nach über 40-stündiger Inkubation beobachtet werden.
 - c) Die ausreichende chromatographische Auftrennung von Lecithin, Lysolecithin, freien Fettsäuren und Cholesterinestern erlauben prinzipiell mit dieser Testmethode eine quantitative Fettsäurebilanz des Abbaus von ^3H - ^{32}P -markiertem Lecithin im Serum.
- 2) Versuche zur Kinetik des Lecithinabbaus im Serum

Zur Differenzierung der am Lecithinabbau beteiligten hydrolytischen Prozesse wurde folgender Versuch unternommen:

Abb. 4: Zunahme der Konzentration von markiertem Lysolecithin mit und ohne Zusatz von Inhibitor zum Serum



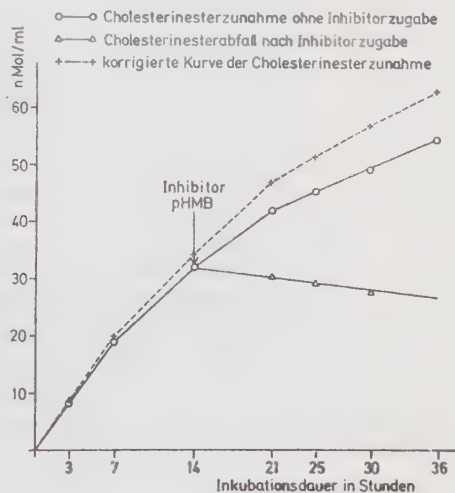
Im Rahmen eines Kinetikexperimentes wurde die Versuchsreihe (Einzelansätze: 1 mg mark. Lec./ml Serum, Cialit 1:10000) nach 14 Stunden Inkubation aufgespalten in eine Gruppe, der Enzym-inhibitor (Parahydroxymercuribenzoat 10 mM) zugegeben wurde

und eine zweite, die ohne Inhibitorzusatz weiter inkubiert wurde. Parallel dazu wurde unter den gleichen Bedingungen hitzeinaktiviertes Serum (1 Stunde, 63°) auf seine Lecithinhydrolyse ausgetestet. Alle Werte wurden als Mittel von Doppelansätzen gewonnen.

Ergebnisse der Messung der Lysolecithinzunahme (Abb. 4):

- a) Auch nach Inhibitorzugabe nimmt Lysolecithin zu, obwohl die Cholesterinveresterung vollständig gehemmt ist (Abb. 5).
- b) Die Lysolecithinzunahme im inhibierten Serum ist etwa gleich groß wie die in hitzeinaktiviertem Serum.
- c) Nach Hemmung der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase durch pHMB wäre zu erwarten, daß die Lysolecithinkonzentration wegen der enzymatischen Hydrolyse durch die Lysolecithinase nicht zu, sondern abnimmt. Die Versuchsergebnisse zeigen demnach, daß auch die Lysolecithinase durch 10 mM pHMB vollständig gehemmt wird.

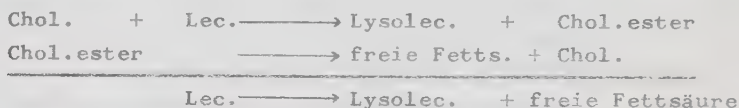
Abb. 5: Verhalten der markierten Cholesterinester in Serum mit und ohne Inhibitorzugabe



Ergebnis der Messung der markierten Cholesterinester (Abb. 5)

- a) Durch 10 mM PHMB wird die Veresterung vollständig gehemmt.
- b) Die bis zum Zeitpunkt der Inhibitorzugabe bereits gebildeten radioaktiv markierten Cholesterinester bleiben nicht erhalten, sondern zerfallen langsam. Da im Serum bei Menschen kein Enzym existiert, das Cholesterinester spaltet (8,42), muß Spontanhydrolyse für diese Abnahme verantwortlich gemacht werden.

Dieser bei der Inkubation von nicht inhibiertem Serum verschleierte Abbauprozess täuscht in der Bilanz eine Lecithinaseaktivität vor:



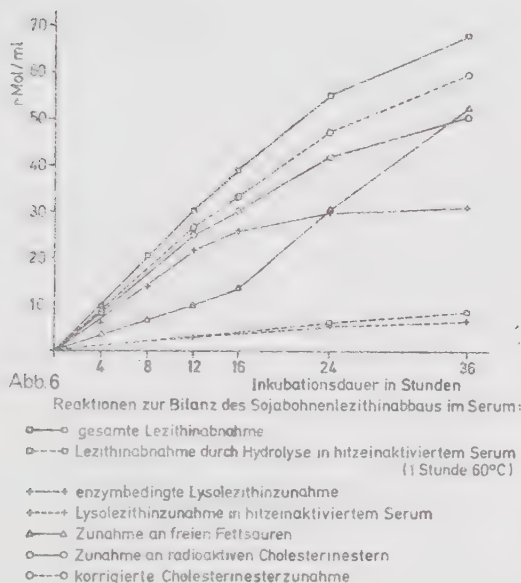
Durch Anwendung des Zerfallsgesetzes ($C = C_0 \cdot e^{-\epsilon t}$) lassen sich Zerfallskonstante und Halbwertszeit errechnen.

Für die Halbwertszeit ergibt sich bei einer Zerfallskonstanten $\epsilon = 0,0102$ $T_{1/2} = 69,5$ Stunden. Daraus kann die Kurve der tatsächlich entstandenen radioaktiven Cholesterinester rekonstruiert werden (Abb. 5). Dies ist im Rahmen der Erstellung einer Fettsäurebilanz notwendig zur Differenzierung und quantitativen Zuordnung der Fettsäurefreisetzung zu den verschiedenen hydrolytischen Prozessen bei der Seruminkubation.

3) Fettsäurebilanz des Abbaus von markiertem Sojabohnenlecithin bei Inkubation mit Humanmischserum

Ultraschalltes Sojabohnenlecithin wurde zu Mischserum (1 mg ^3H - ^{32}P -Lecithin/ ml Serum, Cialit 1:10000) nüchterner Blutspender gegeben und 10 Stunden bei Raumtemperatur präinkubiert, um eine Äquilibration von Sojabohnen- und nativem Lecithin zu erreichen. In dem anschließenden Kinetikexperiment wurde, wiederum in Form von Doppelansätzen, die Konzentration an radioaktivem Lecithin, Lysolecithin, Cholesterinestern und freien Fettsäuren über 36 Stunden ver-

folgt. Gleichzeitig wurde die Hydrolyse des Lecithins in hitzeinaktiviertem Serum (1 Stunde, 60°) gemessen:



Ergebnis:

- a) Es zeigte sich, daß sich mit der gewählten Testmethode eine Bilanz der Abbauvorgänge erstellen läßt, die in der Fettsäuresummenbilanz maximale Abweichungen von $\pm 3\%$ aufweist (Tab. 1)

Tabelle 1: Fettsäurebilanz des Lecithinabbaus

Zeit	A B N A H M E		Z U N A H M E			D I F - F E R E N Z		
	Lec.- abbau nMol/ml	Summe der abgeb. Fettsäuren nMol/ml	Lyso- lec. nMol/ ml	Chol. ester nMol/ ml	freie Fetts. nMol/ ml	Summe der Fs.-zu- nahme	Diff. von FS- Ab-u. Zu- nahme nMol/ ml	Diffe- renz in %
4h	9,5	19,0	6,9	8,15	3,8	18,85	-0,15	-0,79
8h	20,6	41,2	15,86	20,1	6,8	42,8	+1,2	+2,9
12h	30,3	60,6	24,8	25,0	9,8	59,6	-1,0	-1,6
16h	38,0	76,0	29,6	30,4	13,6	73,6	-2,4	-3,15
24h	55,5	111,0	35,2	42,3	31,0	108,5	-2,5	-2,25
36h	68,5	137,0	35,9	51,0	52,7	139,6	+2,6	+1,9

Tabelle 2: Bilanz der am Lecithinabbau beteiligten Reaktionen

Zeit	Abnahme des Lecithin nMol/ml	Zunahme der Chol.ester ⁺ nMol/ml	Diffe- renz in nMol/ml	Diffe- renz in %	Lecithin- abnahme in hitzeinakt. Serum nMol/ml
12h	30,3	27,4	2,9	9,55	2,7
24h	55,5	47,5	8,0	14,4	6,1
36h	68,5	59,4	9,1	13,3	8,2

(⁺ korrigierte Cholesterinesterwerte (nach Absch. I/2))

- b) Ein Vergleich der molaren Abnahme von Lecithin und der Zunahme von Cholesterinestern (s. Tabelle 2) zeigt, daß neben dem durch die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) verursachten Lecithinabbau noch eine weitere zusätzliche hydrolytische Aktivität nachweisbar ist. Die hydrolytische Aktivität im hitzeinaktivierten Serum (1 Stunde, 60°), das mit Sicherheit keine LCAT-Aktivität mehr aufweist, ist nur geringfügig niedriger als diese zusätzliche hydrolytische Aktivität im Normalserum. Die Existenz eines weiteren Lecithin abbauenden Enzyms neben der sicher vorhandenen Spontanhydrolyse des Lecithins kann deshalb mit dieser Versuchsanordnung nicht abgegrenzt werden, weil der hydrolytische Abbau im inaktivierten Serum, dem der fraglichen Aktivität nahezu entspricht (Tab. 2); er könnte neben der Spontanhydrolyse auch durch eine hitzestabile Lecithinase mitverursacht sein. Gerade Lecithinasen sind bekannt für ihre Hitzestabilität (43 - 45). Die Ergebnisse von Versuch I/2b (s. Abb. 4) würden dann so zu deuten sein, daß diese angenommene Lecithinase durch Parahydroxymercuribenzoat (10 mM) nicht gehemmt wird.
- In jedem Fall machen die Spontanhydrolyse und die mögliche Lecithinaseaktivität zusammen in der Phase des maximalen Lecithinabbaus während der ersten 12 Stunden der Kinetik insgesamt weniger als 10 % des Gesamtabbaus aus.

II) Untersuchungen zur Fettsäurespezifität des Lecithin- und Lysolecithinabbaus.

1) Vergleich des Abbaus von Sojabohnenlecithin gegenüber nativem Lipoproteinlecithin.

Um festzustellen, ob durch die für den Katabolismus des Lecithins verantwortlichen Serumenzyme das Sojabohnenlecithin mit anderer Abbaurate metabolisiert wird als das native Lipoproteinlecithin, wurde folgender Versuch gemacht: Ansätze von Serum zusammen mit markiertem Lecithin wurden über verschieden lange Zeiträume inkubiert und der Lecithin-

abbau des gesamten eingesetzten Lecithins durch Phosphorbestimmung und der Abbau des markierten Lecithins gleichzeitig durch Scintillationszählung verfolgt.

Ein einzelner Versuchsansatz enthielt:

0,84 ml Serum + 0,16 ml Sojabohnenlecithin, ultrabeschallt in

0,9 % NaCl pH 7,4 + Cialit 1:10000

Menge des gesamten Lecithins pro Ansatz: 2,7 mMol

Menge des markierten Lecithins je Ansatz: 0,364 mMol

Verhältnis des markierten Lecithins aus Sojabohnen zum Gesamtlecithin: 1 : 7,45

Um den Abbau beider Lecithine zu vergleichen, wurden die Werte des radioaktiven Lecithins mit demselben Faktor 7,45 multipliziert (Abb. 7). Durch den hohen Verdünnungsfaktor kann die Kurve vom Abbau des gesamten Lecithins mit dem des nativen Serumlecithins gleichgesetzt werden.

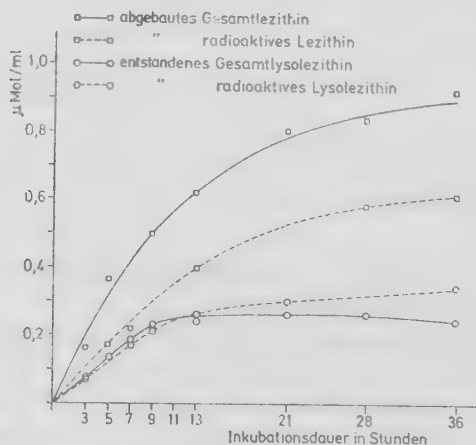


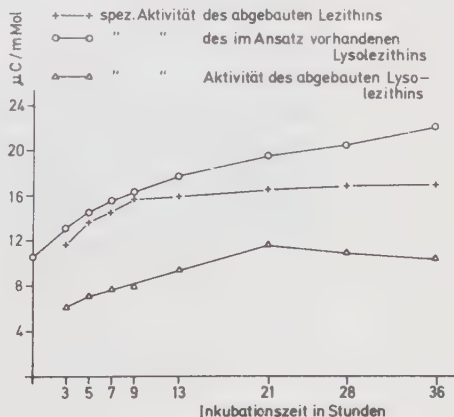
Abb.7 Vergleich des Abbaus von radioaktiv markiertem Soja-lezithin und nativem Serumlecithin

Ergebnis:

- a) Das native Serumlecithin wird besser abgebaut als das radioaktive Sojabohnenlecithin. Für den Zeitraum 0 bis 9 Stunden nach Inkubationsbeginn beträgt das Verhältnis der Abbauraten des unmarkierten zum markierten Lecithin 1,66 : 1. In diesem Zeitraum hat sich das exogen zugeführte radioaktive Lecithin noch nicht mit dem nativen Serumlecithin in den Lipoproteinen vollständig ins Gleichgewicht gesetzt (s. auch Abb. 8)
- Für den Zeitraum zwischen 9 bis 36 Stunden nach Inkubationsbeginn, für den eine annähernd vollständige Gleichgewichtseinstellung angenommen werden kann (s. Abb. 8 und Abschn. II 2a) beträgt das Verhältnis der Abbauraten des unmarkierten zum markierten Lecithin 1,24 : 1.
- b) Das entstehende radioaktive Lysolecithin wird stärker akkumuliert als das aus nativem Serumlecithin gebildete. Dies deutet darauf hin, daß das Sojabohnenlecithin in geringerem Umfang als das native abgebaut wird.
- 2) Veränderungen der spezifischen Radioaktivität des abgebauten Lecithins, des gebildeten und des weiter abgebauten Lysolecithins im Verlauf der Inkubation.

Um die unterschiedlichen Abbauraten der verschiedenen Lecithine und Lysolecithine im Zusammenhang mit dem zeitlichen Abstand vom Inkubationsbeginn zu erfassen, wurden aus den gegebenen Werten (Abb. 7) die jeweilige spezifische Aktivität (= $\mu\text{Ci}/\text{mMol}$ Gesamtlecithin bzw. Lysolecithin) errechnet:

Abb. 8: Veränderungen der spezifischen Radioaktivität von Substraten und Produkten des Lecithinkatabolismus im Verlauf der Inkubation



Ergebnis:

- a) Die spezifische Radioaktivität des abgebauten Lecithins steigt bis neun Stunden nach Inkubationsbeginn an und bleibt dann annähernd konstant. Der Anstieg ist ein Maß für die zunehmende Durchmischung von radioaktivem mit unmarkiertem Lecithin in den Lipoproteinen, da das freie nicht an Lipoprotein gebundene Lecithin nicht an der enzymatischen Umsetzung teilnehmen kann (46 - 48). Sobald die Durchmischung von exogenem und endogenem Lecithin in den Lipoproteinen sich dem Gleichgewichtszustand nähert, erreicht die spezifische Aktivität des abgebauten Lecithins zunehmend einen konstanten Endwert.
- b) Die spezifische Radioaktivität des Lysolecithins liegt dauernd über der spezifischen Aktivität des abgebauten Lecithins und steigt bis zum Ende kontinuierlich an. Dies kann nur geschehen, wenn der Abbau des unmarkierten Lysolecithins schneller erfolgt als der des markierten.
- c) Wie ausgeprägt die Substratspezifität der Lysolecithinase ist, läßt sich an dem Unterschied der spezifischen Aktivitäten von abgebautem Lysolecithin (= abgeb.Lec.- nicht abgeb.Lysolec.) und nicht abgebautem Lysolecithin (= gemessenem Lysolec.) demonstrieren. Die spezifische Aktivität des abgebauten Lysolecithins beträgt im Verlauf der Inkubation nur zwischen 46 bis 58 % der spezifischen Aktivität des nicht abgebauten Lysolecithins, das heißt, es wird etwa doppelt soviel unmarkiertes wie markiertes Lysolecithin abgebaut.

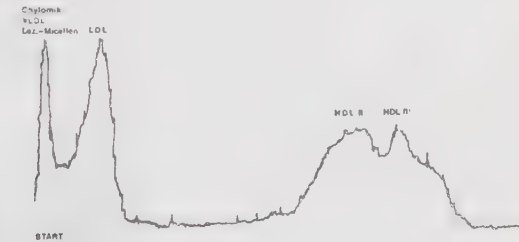
C) Untersuchung des Abbaus von ^{32}P - ^3H -Lecithin im Serum mittels Polyacrylamid-Elektrophorese und Autoradiographie

- 1) Serumlipoproteindarstellung durch Elektrophorese mit anschließender Autoradiographie.

Zur weiteren Bestätigung der Vorstellung, daß das exogen zugeführte Sojalecithin sich mit dem nativen Serumlecithin

in den Lipoproteinen ins Gleichgewicht setzt und der Abbau des Lecithins dann an den Lipoproteinmolekülen stattfindet, wurde folgender Versuch unternommen:
Serum wurde mit ^{32}P - ^3H -Lecithin versetzt (1 mg mark.Lec./ml Serum) und 12 Stunden bei 37° sowie ein Kontrollansatz bei 4° inkubiert. Beide Versuchsansätze wurden dann einer Serum-elektrophorese in 3,5 % Polyacrylamidgel unterworfen, mit Amidoschwarz gefärbt und anschließend von dem Gel eine Autoradiographie auf Röntgenfilm angefertigt. So wurde die verborgene Verteilung des ^{32}P -Lecithins auf die Serumproteine zusätzlich zum normalen Serumelektrophoreschbild dargestellt. Mit Hilfe eines Densitometers wurde die zonalen Schwärzungen auf dem Röntgenfilm in Kurven umgeschrieben (s. Abb. 9a und 9b).

Abb. 9 a) Serum + ^{32}P -Lecithin, 12 Stunden bei 37° inkubiert

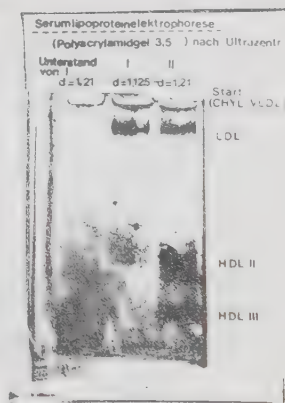


b) Serum + ^{32}P -Lecithin, Kontrolle 4°



Zur Identifizierung der in der Autoradiographie dargestellten Fraktionen wurde unter gleichen Bedingungen eine Serumlipoprotein-Elektrophorese von Lipoproteinfraktionen, die durch Ultrazentrifugation bei erhöhter Dichte isoliert worden waren, durchgeführt. Durch 24-stündige Ultrazentrifugation bei einer Dichte von 1,21 wurden im Überstand die Gesamtlipoproteine erhalten und elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 10/I). Zur Identifikation der High-Density-Lipoproteinklassen II und III wurde zunächst der bei einer Dichte von 1,125 gewonnene Überstand, der Low-Density- und High-Density-Lipoprotein II enthält, aufgetrennt (s. Abb. 10/I). High-Density-Lipoprotein III konnte durch Rezentrifugation des Unterstandes bei einer Dichte von $d = 1,21$ (24 Stunden, 164000 g) nunmehr im Überstand isoliert angereichert werden und seine elektrophoretische Wanderungsweite bestimmt werden (s. Abb. 10/II Unterstand von I)

Abb. 10: Polyacrylamid-elektrophorese von Serumlipoproteinen



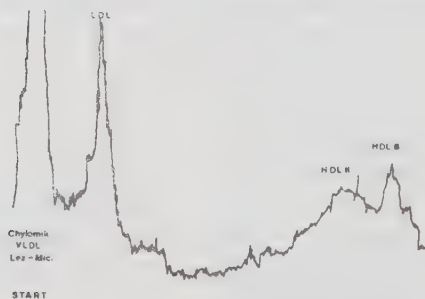
Ergebnis der Autoradiographie (s. Abb. 9a und 9b):

- a) Es zeigte sich, daß erwartungsgemäß ein großer Teil des exogenen, durch Ultrabeschallung in micellare Form gebrachten Lecithins in eine der Lipoproteinfraktionen abwandert.

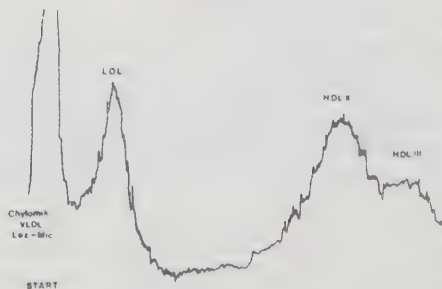
- b) Daß es sich bei den densitographisch dargestellten Gipfein um Lipoproteinfraktionen handelt, zeigt der Vergleich der elektrophoretischen Wanderungsweiten mit den isolierten Lipoproteinen (Abb. 10). Dadurch ist zugleich eine Zuordnung möglich. Das micellare, nicht ausgetauschte ^{32}P -Lecithin bleibt ebenso wie die wegen ihrer Molekülgröße in das 3,5 %-ige Gel nicht eindringenden Chylomikronen und Very-Low-Density-Lipoproteine am Auftragsort liegen und ergibt den ersten Gipfel. Die übrigen Gipfel lassen sich als Low-Density-Lipoprotein sowie die Klassen II und III der High-Density-Lipoproteine identifizieren.
- Daß die autoradiographischen Schwärzungen ausschließlich durch die ^{32}P -markierten Lipoproteine hervorgerufen wurde, konnte zusätzlich in prinzipiell gleichem Verfahren durch Serum- und Lipoproteinimmunelektrophorese mit nachfolgender Autoradiographie nachgewiesen werden. Auch dort zeigte sich, daß sich im Serum nur die Lipoproteine mit ^{32}P -Lecithin beluden und deswegen nur sie autoradiographisch darstellbar waren.
- c) Durch die selektive Markierung der Lipoproteine mit ^{32}P -Lecithin ergibt sich die Möglichkeit, auf einfache Weise die Serumlipoprteine ohne vorherige Isolierung durch Ultrazentrifugation autoradiographisch aus Serumelektrophoresen heraus darzustellen.
- d) Die Markierungsmuster des 4° - und des inkubierten 37° -Serumansatzes wiesen in der Autoradiographie reproduzierbare, charakteristische Unterschiede auf:
- der Startgipfel, in dem sich vor allem die nicht protein-gebundenen Lecithinmicellen darstellen, war beim 4° -Ansatz wesentlich verstärkt. Dies ist zu erwarten, da der Austausch von exogenem markierten und endogenem Lecithin an den Lipoproteinen bei höherer Temperatur beschleunigt verläuft.
 - die Markierung des Low-Density-Lipoproteins nimmt durch die Inkubation zu.
 - bei den High-Density-Lipoproteinen verlagert sich durch die Inkubation das Schwergewicht der radioaktiven Markierung von den HDL III zu den HDL II.

- 2) Untersuchung der durch Wärmeinkubation verursachten Änderung des radioaktiven Markierungsmusters der Serumlipoproteine
- Um nachzuprüfen, ob die beschriebenen Veränderungen allein temperaturbedingt oder ob sie vom enzymatischen Lecithinabbau durch die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase verursacht sind, wurde folgender Versuch gemacht:
- Zwei mit ^{32}P -Lecithin versetzte Serumansätze (1 mg mark. Lec./ml Serum) wurden 12 Stunden bei 37° inkubiert. Einer der beiden Ansätze enthielt einen enzymhemmenden Zusatz von p-Hydroxymercuribenzoat (2 mM). Die Serumelektrophorese mit nachfolgender Autoradiographie ergab folgendes Bild:

Abb 11 c, Serum + ^{32}P -Lecithin + Enzyminhibitor (Parahydroxymercuribenzoat 10 mM)
12 Stunden bei 37° inkubiert



d, Serum + ^{32}P -Lecithin, Kontrollansatz ohne Enzyminhibitor
12 Stunden bei 37° inkubiert



Ergebnis (Abb. 11 c und d):

- a) Da das Low-Density-Lipoprotein in beiden Ansätzen etwa gleich markiert ist, scheint die verminderte ^{32}P -Aktivität im 4° -Ansatz (s. Abb. 9b) ausschließlich ein Temperatureffekt zu sein.
- b) Die Veränderung des High-Density-Lipoprotein-Markierungsmusters dagegen ist keine ausschließlich temperaturbedingte Reaktion:

Bei Inkubation steigt die Radioaktivität der HDL-II-Fraktion an, während die HDL-III-Fraktion absinkt. Dieser Vorgang kann trotz Wärmeinkubation durch den Enzymhemmer Para-hydroxymercuribenzoat blockiert werden (Abb. 11 c und d). Für die Annahme, daß die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) in ursächlichem Zusammenhang mit den beobachteten Änderungen der radioaktiven Markierung der HDL-Subfraktionen steht, sprechen folgende Fakten:

- Die LCAT baut im Serum das an die Lipoproteine gebundene Lecithin ab. Dabei sind die HDL-Lipoproteine bevorzugtes Substrat (49).

- Die LCAT ist neben der im Nüchternserum inaktiven Lipoproteinlipase das für den Stoffwechsel der Lipoproteine quantitativ bedeutendste Enzym (50).

- Die LCAT ist durch pHMB (2 mM) vollständig hemmbar (8). Als Erklärungsmöglichkeiten für die Änderung der Markierung der HDL-Subfraktionen bieten sich an:

- Das Lecithin des HDL-II ist bevorzugtes Substrat für den Lecithinabbau durch die LCAT. Das abgebaute zunächst vorwiegend unmarkierte endogene Lecithin wird durch markiertes ^{32}P -Lecithin ersetzt und dadurch das HDL-II stärker radioaktiv markiert. Durch diesen Vorgang kann aber nicht die Abnahme der Radioaktivität in der HDL-III-Fraktion erklärt werden.

- Das Lecithin des HDL-III ist bevorzugtes Substrat für die LCAT. Als Folge der Enzymaktivität geht HDL-III über in HDL-II.

III) Die Hemmung der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase durch freie Fettsäuren

1) Die Veränderung der elektrophoretischen Beweglichkeit der Serumlipoproteine unter dem Einfluß von Natriumoleat.

Ausgehend von Untersuchungen von DAWSON (51) über die Beeinflussbarkeit der Enzymaktivität von Lecithinasen durch Änderung der elektrischen Ladung des Substrats, wurde untersucht, ob eine Änderung der elektrophoretischen Beweglichkeit der High-Density-Lipoproteine sich auf die Aktivität der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase auswirkt.

Eine Änderung der elektrischen Ladung der High-Density-Lipoproteine wurde durch Zugabe von amphipathischen Substanzen zu Serum erreicht: Taurocholat, Natriumdodecylsulfat und Natriumoleat bewirkten eine Zunahme der elektrophoretischen Beweglichkeit, Cetyltrimethylammoniumbromid eine Abnahme der elektrophoretischen Beweglichkeit der High-Density-Lipoproteine.

Zugleich konnte durch Austestung der enzymatischen Aktivität der LCAT eine Hemmung der Veresterung nach Hinzufügen der amphipathischen Substanzen beobachtet werden. Von den beschriebenen Substanzen war bisher nur Taurocholat als Hemmer der LCAT-Reaktion bekannt (8).

Für eine Hemmung der Enzymaktivität zwischen 90 und 100 % bei gleichzeitiger Änderung der elektrophoretischen Beweglichkeit als Substrat dienenden High-Density-Lipoproteine reichten folgende Hemmstoffkonzentrationen:

Na-Taurocholat	5 mM
Na-Dodecylsulphat	1 mM
Na-Oleat	7,5 mM
Cetyltrimethylammoniumbromid	5 mM

Die Hemmung der LCAT-Reaktion durch Na-Oleat wurde näher untersucht. Sie erschien besonders interessant, weil mit diesem Hemmungsmechanismus über Änderungen der Fettsäurekonzentration im Blut unter physiologischen oder pathologi-

schen Bedingungen eine Beeinflussung der Cholesterinveresterung im Serum denkbar ist.

Für die elektrophoretischen Untersuchungen wurde wiederum ^{32}P -Lecithin-versetztes Serum (1 mg ^{32}P -Lec./ml) verwendet, dem in unterschiedlichen Konzentrationen Na-Oleat zugesetzt wurde. Vor der Elektrophorese wurde 7 Stunden bei 37° inkubiert. Von den Serumelektrophoresen wurden zur Darstellung der Lipoproteine Autoradiographien angefertigt.

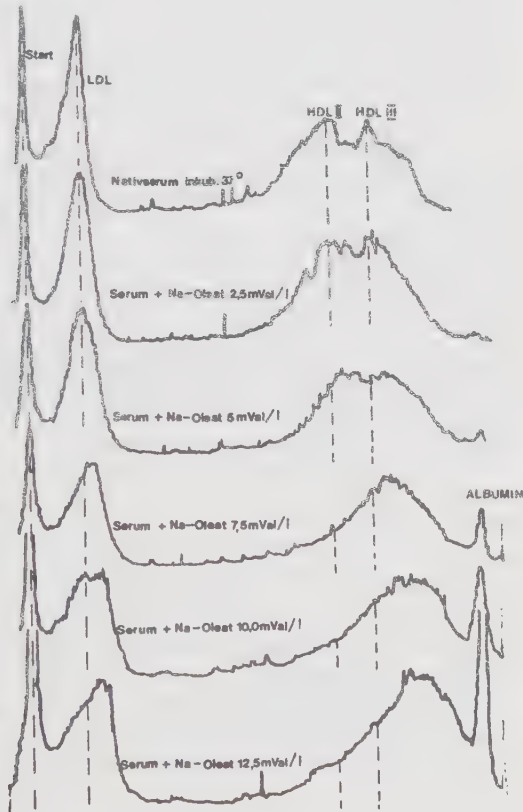


Abb. 12: Veränderung der elektrophoretischen Beweglichkeit von Serumlipoproteinen unter dem Einfluß von Na-Oleat

Die autoradiographische Darstellungsweise bietet den Vorteil, daß der ladungsverändernde Einfluß des Na-Oleats auf die Lipoproteine im Serummilieu selbst, vor allem in Gegenwart des primären Fettsäureakzeptors Albumin dargestellt werden kann. Die Anwendung der Vertikal-Gelplatten-Elektrophorese erlaubte es, alle Proben gleichzeitig im selben Gel unter völlig identischen Bedingungen laufen zu lassen.

Es zeigte sich (Abb. 12), daß mit steigender Fettsäurekonzentration vor allem die High-Density-Lipoproteine eine größere elektrophoretische Beweglichkeit bekommen. Ab einer Konzentration von 7,5 mVal/l läuft ein beträchtlicher Teil der High-Density-Lipoproteine sogar mit der Front der Albumine. Die unterschiedlichen Wanderungsweiten von HDL-II und HDL-III werden bei höherer Oleatkonzentration aufgehoben.

2) Die Hemmung der Cholesterinveresterung unter dem Einfluß von Na-Oleat.

Die mit ^{32}P - ^3H -Lecithin versetzten Serumansätze mit unterschiedlichem Na-Oleat-Gehalt wurden 7 Stunden bei 37° inkubiert und die Zunahme der ^3H -Aktivität in der Cholesterin-esterfraktion durch den Transfer von ^3H -Fettsäuren vom Lecithin zum Cholesterin als Maß für die Aktivität der LCAT genommen:

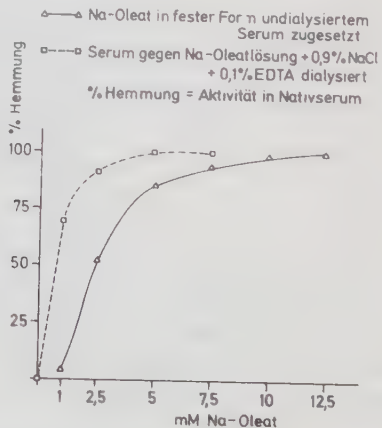


Abb. 13: Hemmung der Cholesterinveresterung unter dem Einfluß von Na-Oleat

Ergebnis:

- a) Die Hemmwirkung des Na-Oleats tritt in dem Konzentrationsbereich auf, der auch Änderungen in der elektrophoretischen Wanderungsweite der Substratlipoproteine erkennen läßt.
- b) Die Hemmwirkung ist nicht durch eine pH-Verschiebung bedingt. Durch die Na-Oleatzugabe in den angegebenen Mengen ändert sich das pH nicht. Dies ist auch aus der Literatur bekannt (52).
- c) Die Hemmwirkung des Na-Oleats kann durch EDTA-Zusatz verstärkt werden (Abb. 13). Durch EDTA werden die Calciumionen des Serums weggefangen, die sonst immer einen Teil der zugegebenen Fettsäuren durch Bildung unlöslicher Salze in ihrer Hemmwirkung inaktivieren.
- 3) Die Beeinflussung der LCAT-Reaktion durch endogen entstehende freie Fettsäuren.

Es wurde untersucht, ob nicht nur exogen zugeführte sondern auch endogen entstehende freie Fettsäuren die Cholesterinveresterung beeinflussen können, als Modell für eine mögliche in vivo ablaufende physiologische oder pathophysiologische Änderung im Lecithin-Cholesterin-Metabolismus. Im Rahmen eines Kinetikexperimentes wurde Serum des gleichen Individuums vor und 20 Minuten nach intravenöser Injektion von 7500 Einheiten Heparin gewonnen, mit ^3H - ^{32}P -Lecithin (1 mg/1 ml Serum) versetzt und die beiden Seren auf ihre Cholesterinveresterung untersucht (Abb. 14).

Gleichzeitig wurde die Lysolecithinentstehung verfolgt (Abb. 15) und aus Parallelansätzen der Anstieg der Konzentration der freien Fettsäuren bestimmt (Abb. 16). Alle Werte stellen das Mittel aus Doppelansätzen dar.

Abb.14: Unterschiedliche Cholesterinveresterung in Prae- und Postheparinserum

○ — ○ POSTHEPARINSERUM
+ —+ SERUM VOR HEPARININJEKTION

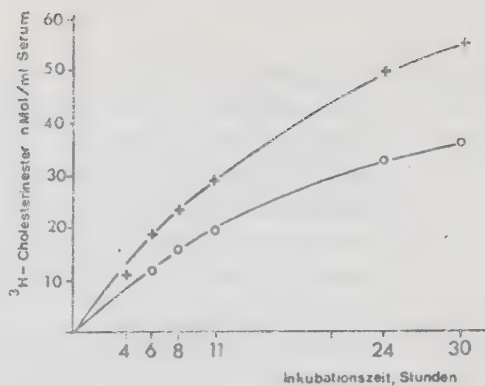


Abb.15: Lysolecithinzunahme in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

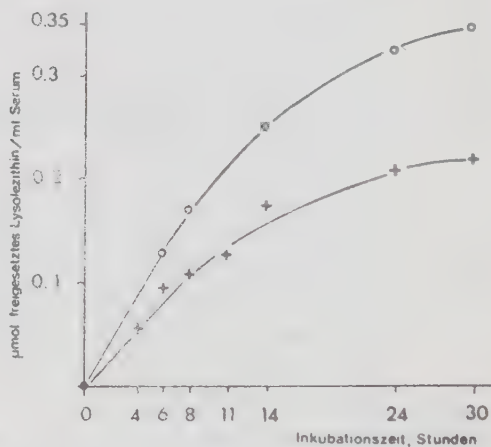
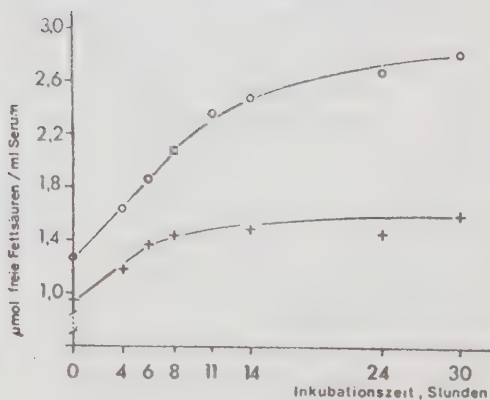


Abb.16: Zunahme der Konzentration der freien Fettsäuren in Prae- und Postheparinserum



Ergebnisse:

- a) Die Cholesterinveresterung im Postheparinserum ist auf zwei Drittel der LCAT-Aktivität des Serums vor Heparin-injektion reduziert (Abb. 14).
Durch Zusatzversuche konnte ein direkter Einfluß des Heparin ausgeschlossen werden: Heparinzugabe bis zu 40 Einheiten/ml Serum nach der Blutabnahme änderte nichts an der Cholesterinveresterungsrate im Serum.
- b) Die erhöhte Lysolecithinfreisetzung im Postheparinserum (Abb. 15) ist durch die zusätzliche Lecithinhydrolyse der Postheparinlecithinase bedingt. Diese spaltet vom Lecithin eine Fettsäure in C1-Position ab (53, 54).
- c) Der starke Anstieg der Fettsäurekonzentration im Postheparin serum ist bedingt durch die heparininduzierte Aktivierung von Lipoproteinlipase und Postheparinlecithinase..
Da diese beiden Enzyme bei den gegebenen Versuchsbedingungen nicht unter optimalen Bedingungen arbeiten (53, 55, 56) und selbst auch durch die entstehenden freien Fettsäuren gehemmt werden, erreicht die Konzentration der freien Fettsäuren nur einen Grenzwert von 2,8 mVal/l.
Trotzdem bewegt sich die Fettsäurekonzentration im Postheparinserum während der Inkubation in einem Bereich, der nach dem Versuch III 2 mit der Hemmung der LCAT durch exogene Erhöhung der Fettsäurekonzentration (s. Abb. 13) eine Verminderung der Cholesterinveresterung erwarten läßt. Daneben dürfte aber auch für die tatsächlich eingetretene partielle Hemmung der LCAT der zusätzliche Verlust an Substrat lecithin durch die Postheparinlecithinase mit verantwortlich sein.

IV) Untersuchung der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase-Aktivität im Serum von klinisch gesunden Blutspendern.

1) Entwicklung der Testmethode

Es wurde eine standardisierte Testmethode zur Untersuchung von gruppen- bzw. individualspezifischen Unterschieden in der LCAT-Aktivität entwickelt:

Bei Mischseren von fünf Männern und fünf Frauen (Alter jeweils zwischen 20 und 30 Jahren) wurden durch Ultrazentrifugation die Lipoproteine abgetrennt, der Unterstand nach Dialyse als Enzymfraktion verwendet und standardisiert präpariertes markiertes Substratlipoprotein (s. Methoden 10) hinzugefügt. Die Zunahme der Radioaktivität der Cholesterinesterfraktion wurde 12 Stunden verfolgt. Alle Werte wurden als Mittel von Doppelansätzen gewonnen.

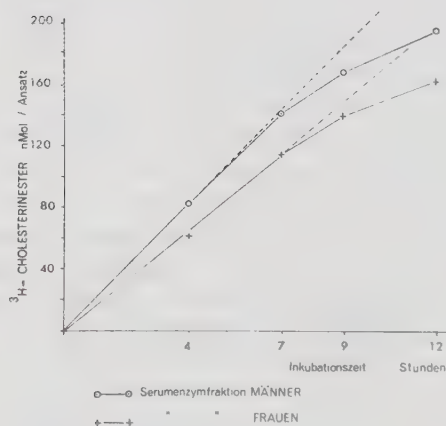


Abb. 17: Geschlechtsunterschiedliche Cholesterinveresterung in inkubiertem Mischserum

Ergebnisse:

- a) Die Veresterungsrate stieg bis sieben Stunden nach Inkubationsbeginn annähernd linear an (Abb. 17). Bis zu diesem Zeitpunkt wurde zugleich genügend Substrat umgesetzt,

um durch Radioaktivitätszählung die abgelaufenen Reaktionen mit hinreichender Genauigkeit verfolgen zu können, vor allem aber um kleinere quantitative Unterschiede in der Veresterungsrate gegenüber gerätebedingten Zählchwankungen bei akzeptablen Zählzeiten abgrenzen zu können.

Für die folgenden Untersuchungen wurde daher eine standardisierte Inkubationszeit von 7 Stunden gewählt.

- b) Für die Veresterungsraten der Serumenzymfraktionen von Männern und Frauen im linearen Bereich ergab sich bei einem mittleren Fehler von $\pm 1,6 \%$ der durch Bestimmung aus Doppelan-sätzen erhaltenen Werte eine Verringerung der Cholesterin-esterbildungsrate bei Frauen auf 81,5 % der bei Männern gemessenen Werte.

2) Untersuchung der LCAT-Aktivität und der Lysolecithinzunahme in Serum von gesunden Männern, Frauen und Schwangeren.

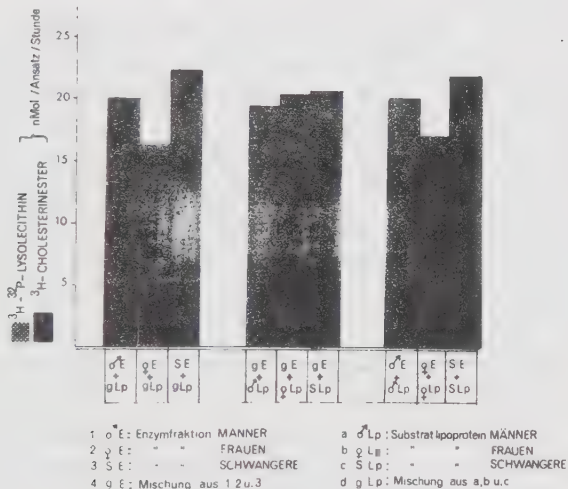


Abb. 18: Unterschiede in der Cholesterinveresterung und der Lysolecithinzunahme bei verschiedenen Enzym-Substratkombinationen aus Serum von Männern, Frauen und Schwangeren.

Mischserum von gesunden männlichen und weiblichen Blutspendern, sowie von Schwangeren (jeweils 5 Spender, Altersgruppe 20 bis 30 Jahre) wurde ultrazentrifugiert und Enzym- sowie Lipoproteinfraktionen getrennt gewonnen. Die Lipoproteinfraktionen wurden in der beschriebenen Weise (s. Methoden 10) markiert und Ansätze mit variierenden Enzym-Substrat-Kombinationen gebildet:

In drei Experimentgruppen wurden jeweils

- a) die verschiedenen Enzymfraktionen mit einem gemeinsamen gleichen Substrat
- b) die verschiedenen Substrate mit einer gemeinsamen gleichen Enzymfraktion
- c) die verschiedenen Enzymfraktionen mit ihren jeweils entsprechenden Substraten ausgetestet.

Von jeder einzelnen Kombination wurden drei gleiche Ansätze inkubiert und für das Endergebnis der Mittelwert gebildet.

Ergebnis (Abb. 18):

- a) - gemeinsames Substrat - verschiedene Enzymfraktionen
Die LCAT-Aktivität ist in der Enzymfraktion aus Frauenserum gegenüber Männerserum durchschnittlich um 19 % erniedrigt, bei Schwangeren dagegen um 11 % erhöht.
Die Lysolecithinzunahme ist bei Frauen wegen der verminderten LCAT-Aktivität erwartungsgemäß ebenfalls erniedrigt (74,5 % des Wertes in Männerserum).
Dagegen weist das Schwangerenserum trotz gesteigerten LCAT-Aktivität nur eine geringe Lysolecithinzunahme auf, nämlich 64 % des Wertes im Männerserum. Dieses Phänomen ist durch eine gesteigerte Lysolecithinaseaktivität im Schwangerenserum bedingt.
- b) - gemeinsames Enzym - verschiedene Substratfraktionen -
Da sowohl in der LCAT- als auch in der Lysolecithinaseaktivität, auch bei wiederholten Versuchen keine eindeutig reproduzierbaren Unterschiede durch die Verwendung verschiedener Substratlipoproteine gefunden werden konnten, scheinen

die geschlechts- bzw. schwangerschaftsbedingten Unterschiede in der Lipidzusammensetzung der Lipoproteine (34, 35, 93), auf die Enzymaktivitäten keinen wesentlichen Einfluß zu haben.

c) - homologe Enzym-Substratkombination -

Die homologen Enzym-Substratkombinationen, die natürliche Serumbedingungen nachahmen, zeigen ein a) prinzipiell gleiches Bild, wobei die Unterschiede weniger stark ausgeprägt sind:

	LCAT-Aktiv.	Lysolec. zunahme
Männer	100 %	100 %
Frauen	85 %	85,5 %
Schwangere	108,5 %	75 %

Der mittlere Fehler der Dreifachbestimmungen betrug $\pm 1,9$ %.

3) Untersuchung der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase-Aktivität auf alters- und geschlechtsbedingte Unterschiede

Die Seren von 80 klinisch gesunden Blutspendern wurden nach dem beschriebenen standardisierten Testverfahren (s. Methoden 10) auf die jeweilige individuelle Veresterungsrate untersucht und die Ergebnisse nach Alter und Geschlecht aufgeschlüsselt. Alle Seren wurden in Doppelversuchen ausgetestet und daraus das jeweilige Mittel errechnet.

Das Serum der Kinder wurde von der Ambulanz der Hauner'schen Universitätskinderklinik zur Verfügung gestellt.

Das Serum der Erwachsenen zwischen 20 und 50 Jahren stammt von freiwilligen Blutspendern der Blutbank München (Dr. Rasch)

Das Serum der Erwachsenen über 50 Jahre wurde von der Ambulanz der Chirurgischen Universitätsklinik zur Verfügung gestellt.

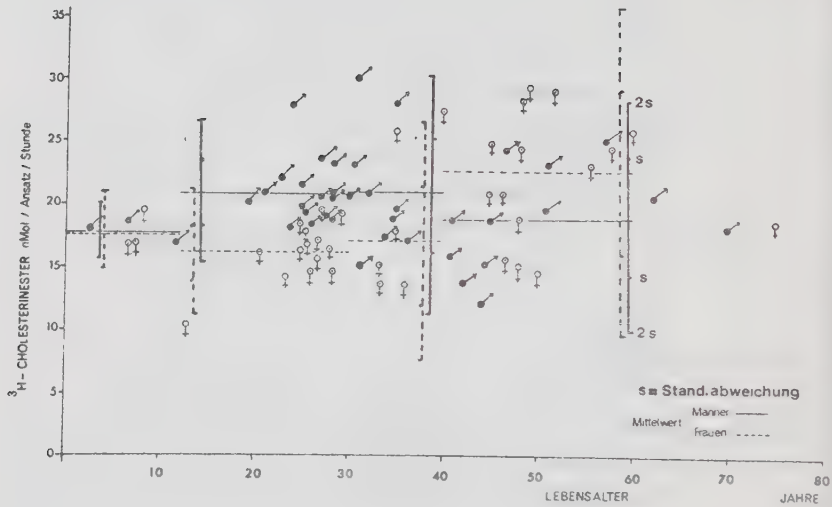


Abb. 19: Die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase-Aktivität bei 80 klinisch gesunden Blutspendern aufgeschlüsselt nach Alter und Geschlecht

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 im einzelnen aufgeführt.

Tabelle 3: LCAT-Aktivität (nMol³H-CE/Ansatz/h) bei
80 Normalpersonen.

	Männer	Frauen
Altersgruppe 3 bis 13 Jahre		
Zahl der untersuchten Personen n	3	3
Mittelwert m	17,85	17,78
Standardabweichung s	0,85	1,53
Altersgruppe 14 bis 29 Jahre		
n	16	14
Mittelwert m	21,05	16,32
Standardabweichung s	2,70	2,46
Standardfehler von m ($S_m = \frac{s}{\sqrt{n}}$)	0,68	0,65
95 %-Vertrauensgrenzen für den wahren Mittelwert (t-Werte nach STUDENT)		
	m ± 1,44	m ± 1,41
Altersgruppe 30 bis 39 Jahre		
n	10	5
Mittelwert m	21,26	17,45
Standardabweichung s	4,77	4,57
Standardfehler von m	1,50	2,04
95%-Vertrauensgrenzen für den wahren Mittelwert		
	m ± 3,40	m ± 5,67
Altersgruppe 40 bis 59 Jahre		
n	10	14
Mittelwert m	18,84	22,78
Standardabweichung s	4,38	5,16
Standardfehler von m	1,39	1,37
95%-Vertrauensgrenzen für den wahren Mittelwert		
	m ± 3,13	m ± 2,97
Altersgruppe 60 bis 75 Jahre		
n	2	2
Mittelwert	19,42	22,35
Mittlerer Fehler der Doppelbestimmungen = ± 1,45 %		

Untersuchung auf Signifikanz der Mittelwertsunterschiede der LCAT-Aktivität bei Männern und Frauen zwischen 14 und 29 Jahren:

a) F-Test auf Gleichheit der Varianzen:

$$\frac{(s_1)^2}{(s_2)^2} = \frac{(2,70)^2}{(2,46)^2} = 1,20 \text{ (Signifikanzschwelle 2,69)}$$

Die zu untersuchenden Wertegruppen unterscheiden sich in ihrer Varianz nicht signifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %)

b) t-Test auf Signifikanz der Mittelwertsunterschiede (94):

$$t = \frac{m_1 - m_2}{s} \cdot \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}}$$

$$s = \sqrt{\frac{88 + 79}{16 + 14 - 2}} = 2,44$$

$$t = \frac{21,05 - 16,32}{2,44} \cdot \sqrt{\frac{16 \cdot 14}{16 + 14}} = 5,29$$

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $P = 5 \%$ ist der t-Wert für diesen Fall $t = \pm 2,048$. Der Unterschied der Mittelwerte ist also signifikant.

Untersuchung auf Signifikanz der Mittelwertsunterschiede der LCAT-Aktivität bei Frauen zwischen 14 und 29 Jahren und Frauen zwischen 40 und 59 Jahren:

a) F-Test auf Gleichheit der Varianzen:

$$F = \frac{(5,16)^2}{(2,46)^2} = 4,40 \text{ (Signifikanzschwelle 2,69)}$$

Die zu untersuchenden Wertegruppen unterscheiden sich in ihrer Varianz signifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %). Aus diesem Grund wurde zur Untersuchung der Signifikanz der Mittelwertsunterschiede der Behrens-Fischer-Test (95) an Stelle des t-Testes angewandt:

$$d = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} = \frac{22,78 - 16,32}{\sqrt{\frac{6,05}{14} + \frac{26,63}{14}}}$$

$$\text{tang } \vartheta = \sqrt{\frac{1,90}{0,43}} = 2,10 \quad \vartheta = 64^\circ 30'$$

Für $\vartheta = 64^\circ 30'$ ergibt sich bei einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von 5 % und je 13 Freiheitsgraden ein Tabellerwert von $d = 2,165$. Das errechnete $d = 2,22$ liegt über diesen Wert. Der Mittelwertsunterschied ist (bei $P = 95 \%$) als signifikant anzusehen.

Obwohl die Zahl der Probanden für die Untersuchung aller Altersgruppen vor allem wegen des technisch aufwendigen Tests sehr klein war, konnten doch die beiden wichtigsten, sich in den Mittelwerten (s. Abb. 19) bereits andeutenden Ergebnisse statistisch untermauert werden:

- a) Mit hoher Wahrscheinlichkeit ($P = 95 \%$) unterscheiden sich die Mittelwerte der LCAT-Aktivität bei jungen Männern und Frauen. Im untersuchten Kollektiv betrug der Mittelwert der Enzymaktivität bei Frauen zwischen 14 und 29 Jahren 78 % der bei gleichaltrigen Männern beobachteten Aktivität.
 - b) Im Gegensatz zur Enzymaktivität bei den Männern nimmt die LCAT-Aktivität bei Frauen im Alter zu. Sie betrug im untersuchten Kollektiv bezogen auf die Mittelwerte bei den Frauen zwischen 40 und 59 Jahren 139 % der Enzymaktivität, die bei den Frauen unter 30 Jahren gefunden wurde.
- 4) Untersuchung der Cholesterinveresterung und der Lysolecithin-entstehung bei schwangeren Frauen

Zur näheren Untersuchung über möglicherweise hormonell bedingte Geschlechtsunterschiede beim Lecithinabbau im Serum wurde die Cholesterinveresterungsaktivität im Serum von 13 schwangeren Frauen einzeln bestimmt. Gleichzeitig wurde die

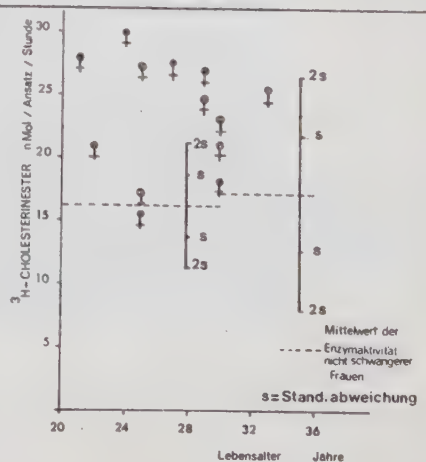
^3H - ^{32}P -Lysolecithinzunahme verfolgt und im gleichzeitig abgenommenen Citratplasma die jeweilige Senkung und Senkungshemmung (Methoden 13 a - c) bestimmt.

Tabelle 4: LCAT-Aktivität, Lysolecithinzunahme und Senkungshemmung bei 13 Schwangeren.

Nr.	Alter	Schwangerschafts- woche	LCAT Akt. nMol ^3H -CE/ Ansatz/h ($^+$)	Lysolec. zunahme nMol ^{32}P - LL/Ans. ($^+$)	Senkungs- hemmung nach 3h Inkubat.	Senkungs- hemmung nach 6h Inkubation
1	21	40	27,8 $\pm$ 0,45	9,1 $\pm$ 0,25	12 %	69 %
2	22	32	21,1 $\pm$ 0,05	6,3 $\pm$ 0,1	-2 %	6 %
3	24	38	29,95 $\pm$ 0,3	10,2 $\pm$ 0,0	14 %	55 %
4	25	29	27,3 $\pm$ 0,45	10,7 $\pm$ 0,15	11 %	46 %
5	25	24	17,1 $\pm$ 0,05	5,2 $\pm$ 0,05	-3 %	8 %
6	25	40	15,5 $\pm$ 0,60	4,3 $\pm$ 0,0	-4 %	4 %
7	27	40	24,3 $\pm$ 0,05	9,05 $\pm$ 1,1	0 %	80 %
8	27	40	27,6 $\pm$ 0,15	9,8 $\pm$ 0,45	12 %	72 %
9	29	40	27,1 $\pm$ 0,0	7,9 $\pm$ 0,0	0 %	58 %
10	30	27	18,25 $\pm$ 0,6	7,8 $\pm$ 0,35	2 %	50 %
11	30	36	23,2 $\pm$ 0,25	8,1 $\pm$ 0,05	0 %	49 %
12	30	40	21,3 $\pm$ 1,3	6,9 $\pm$ 0,15	0 %	52 %
13	33	40	25,9 $\pm$ 0,45	6,7 $\pm$ 0,35	0 %	21 %

($^+$) Mittelwert von Doppelansätzen

Abb. 20: LCAT-Aktivität bei 13 schwangeren Frauen im Vergleich zur Enzymaktivität (Mittelwert u. Standardabweichung) nicht schwangerer Frauen gleicher Altersstufe



Untersuchung auf Signifikanz der Mittelwertsunterschiede der LCAT-Aktivität zwischen schwangeren und nicht schwangeren Frauen der Altersgruppe 20 bis 30 Jahre.

- a) F-Test auf Gleichheit der Varianzen:

$$F = \frac{22,5}{7,29} = 3,086 \quad (\text{Signifikanzschwelle } 2,69)$$

Die Wertegruppen unterscheiden sich in ihrer Varianz signifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %). Deshalb wurde zur Untersuchung der Signifikanz der Mittelwertsunterschiede der Behre Fischer-Test an Stelle des t-Tests angewandt:

- b) Behrens-Fischer-Test auf Signifikanz der Mittelwertsunterschiede:

$$d = \frac{23,37 - 16,32}{\sqrt{1,87 + 0,729}} = 4,373$$

$$\text{tang } \mathcal{V} = \frac{1,87}{0,729} = 1,603 \quad \mathcal{V} = 58^\circ$$

Für $\mathcal{V} = 58^\circ$ ergibt sich bei einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von 1 % und 11 bzw. 13 Freiheitsgraden ein Tabellenwert von $d = 3,02$. Das errechnete $d = 4,373$ liegt über diesem Wert. Der Mittelwertunterschied ist (bei $P = 99\%$) als signifikant anzusehen.

Ergebnis:

- a) Die Mittelwerte der LCAT-Aktivität von schwangeren und nicht schwangeren Frauen bis zum Alter von 30 Jahren unterscheiden sich hoch signifikant ($P = 99\%$). Im untersuchten Kollektiv betrug der Mittelwert der Enzymaktivität bei schwangeren Frauen bis zum Alter von 30 Jahren 142 % der bei gleichaltrigen Frauen, die nicht schwanger waren, gefundenen Aktivität.
- b) Wie bereits Versuch IV2 vermuten ließ, war trotz erhöhter LCAT-Aktivität die Senkungshemmung sehr gering ausgeprägt. In einem großen Teil der Fälle wurde nach 3-stündiger

Inkubation des Citratplasmas bei 37° keine Senkungshemmung oder sogar eine geringe Senkungsbeschleunigung gegenüber der normalen nicht inkubierten Senkung festgestellt. Dies geht parallel mit einer im allgemeinen nur geringen Zunahme der Konzentration von ^3H - ^{32}P -Lysolecithin in den inkubierten Ansätzen.

V) Untersuchung der LCAT-Aktivität, der Lysolecithinzunahme und der Senkungshemmung im Blut von Kranken

1) Untersuchung des Blutes von weiblichen Malignompatienten

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses von Tumorzustand auf die Aktivität der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase im Serum wurde die Cholesterinveresterung bei einer ausgewählten Gruppe von Frauen höheren Alters mit Karzinom oder Sarkom der Geschlechtsorgane bestimmt. Zu gleicher Zeit wurde die ^3H - ^{32}P -Lysolecithinzunahme verfolgt und die jeweilige Senkung und Senkungshemmung im Citratplasma bestimmt.

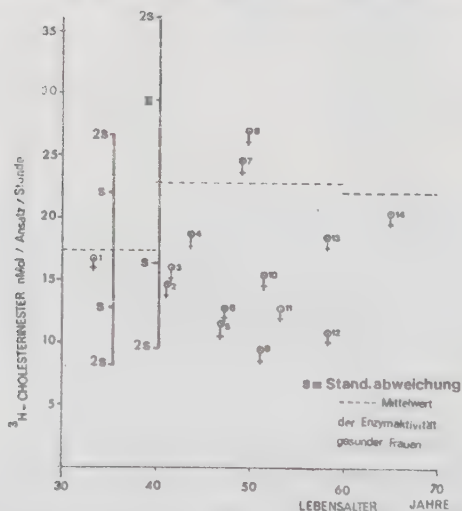


Abb. 21: Untersuchung der LCAT-Aktivität bei 14 weiblichen Malignompatienten im Vergleich zur Normalaktivität (Mittelwert u. Standardabweichung) Frauen gleicher Altersstufe.

Tabelle 5: LCAT-Aktivität, Lysolecithinzunahme und Senkungs-
hemmung bei 14 Malignompatientinnen.

Nr.	Alter	Diagnose	LCAT-Aktiv. nMol ³ H-CE/ Ansatz/h	Lysolec. zunahme nMol ³² P- LL/Ans. /h	BKS 1h/2h	Senkungs- hemmung nach 3h Inkubation	Senkungs- hemmung nach 6h Inkubat.
1	33	retroperit. Liposarkom	16,75 $\pm$ 0,45	11,45 $\pm$ 0,05	18/37	12 %	31 %
2	41	Collum I operiert	16,65 $\pm$ 0,0	10,0 $\pm$ 0,1	20/45	20 %	45 %
3	41	Collum II o.Therapie	16,0 $\pm$ 0,65	10,5 $\pm$ 0,33	27/54	12 %	81 %
4	44	Uterussark. op., bestr.	18,7 $\pm$ 0,15	12,13 $\pm$ 0,15	35/73	19 %	83 %
5	47	Collum II op., Rad.- Einlage	11,55 $\pm$ 0,15	8,3 $\pm$ 0,25	30/53	9,5 %	41 %
6	48	Corpus-Ca III nicht op.	12,6 $\pm$ 0,3	7,8 $\pm$ 0,0	40/71	1 %	44 %
7	49	Collum II-III nicht op.	24,5 $\pm$ 1,15	14,9 $\pm$ 0,75	32/63	52 %	94 %
8	50	Adeno-Ca d. Ovars; Rezid.	27,0 $\pm$ 0,75	19,75 $\pm$ 0,3	25/64	75 %	98 %
9	51	Collum III nicht op.	9,55 $\pm$ 0,0	6,2 $\pm$ 0,0	22/45	0 %	7 %
10	51	Collum III nicht op.	15,5 $\pm$ 0,05	9,35 $\pm$ 0,45	50/81	20 %	69 %
11	52	Collum I op. Rad.- Einlage	12,75 $\pm$ 0,25	8,2 $\pm$ 0,05	23/45	12 %	60 %
12	58	Ca-Rezid. Genitale operiert	10,9 $\pm$ 0,45	6,2 $\pm$ 0,03	30/61	0 %	18 %
13	58	Corpus II nicht op.	17,6 $\pm$ 0,0	12,0 $\pm$ 0,15	20/43	25 %	81 %
14	64	Corpus II nicht op.	20,55 $\pm$ 0,30	16,8 $\pm$ 0,2	66/95	39,5 %	92 %

Der Mittelwertsunterschied der LCAT-Aktivität zwischen Malignompatientinnen der Altersgruppe 40 bis 59 Jahre und gleichaltrigen gesunden Frauen wurde auf Signifikanz untersucht:

- a) F-Test auf Gleichheit der Varianzen:

$$F = \frac{28,46}{26,62} = 1,069 \text{ (Signifikanzschwelle 2,69)}$$

Die Wertegruppen unterscheiden sich in ihrer Varianz nicht signifikant ($P = 5\%$).

- b) t-Test auf Signifikanz der Mittelwertsunterschiede:

$$s = \sqrt{\frac{313,06 + 338,72}{14 + 12 - 2}} = 5,21$$

$$t = \frac{22,78 - 16,11}{5,21} \cdot \sqrt{\frac{12 \cdot 14}{12 + 14}} = 3,252$$

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $P = 1\%$ ist der t-Wert für diesen Fall $t = \pm 2,797$. Der Unterschied der Mittelwerte ist also signifikant.

Ergebnis:

- a) Die Mittelwerte der LCAT-Aktivität der untersuchten krebserkrankten Frauen zwischen 40 und 59 Jahren und gleichaltrigen gesunden Frauen unterscheiden sich signifikant ($P = 99\%$). Bei den untersuchten Gruppen war der Mittelwert der Enzymaktivität bei den Malignompatientinnen auf 71 % der im Mittel bei gesunden Frauen der gleichen Altersgruppe gefundenen Aktivität reduziert.
- b) Im Hinblick auf eine diagnostische Bewertung der LCAT-Aktivität (etwa im Rahmen der Hemmung der Blutkörperchensenkung) ist von Bedeutung, daß zwar die Mittelwerte der Enzymaktivität verschieden sind, aber die Einzelwerte der bei den Patientinnen gefundenen Aktivitäten fast ausnahmslos im 2s-Bereich der Gesunden lagen. In ursächlichem Zusammenhang damit steht die besonders große Streubreite der Werte bei den gesunden Frauen dieser Altersgruppe. Weiterhin wichtig ist der Befund, daß die Enzymaktivitäten

der jüngeren Frauen in der Altersgruppe bis 30 Jahre im Mittel fast identisch sind mit dem bei den Malignompatientinnen (Alter 40 bis 59 Jahre) gefundenen Mittelwert der LCAT-Aktivität

- c) Eine direkte Beziehung zwischen Schweregrad der Erkrankung und Verminderung von LCAT-Aktivität oder Senkungshemmung läßt sich aus den vorliegenden Ergebnissen nicht ableiten.

2) Untersuchung der LCAT-Aktivität, der Lysolecithinzunahme und der Senkungshemmung im Blut von Patienten mit unterschiedlichen Krankheiten

Es wurde das Serum bzw. Plasma von 16 Patienten vorwiegend mit hepatischen Erkrankungen untersucht;

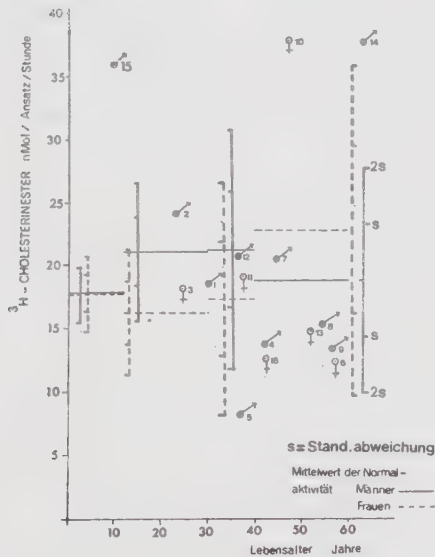


Abb. 22: Untersuchung der LCAT-Aktivität bei verschiedenen hepatischen und anderen Erkrankungen im Vergleich zur alters entsprechenden Normalaktivität (Mittelwert u. Standardabweichung).

Tabelle 6: LCAT-Aktivität, Lysolecithinzunahme und Senkungs-
hemmung bei 16 Patienten vorwiegend mit hepatischen Erkrank-
kungen.

Die biochemischen Werte sind Mittel aus Doppelansätzen.
Bei den mit († bezeichneten Fällen stand kein Citratblut
für die zusätzliche Bestimmung von Senkung und Senkungs-
hemmung zur Verfügung.

Nr.	Gesch. Alter (a)	Diagnose	Klinisch chemische Daten (nach Kranken- blatt)	LCAT-Akt. nmol ³ H-CE /Ans./h	Lysol ec. zunahme nmol ³ F ⁻ Ll/Ans./h	BKS	Senk. hemu. n. 3h Ink.	Senk. hemu. n. 6h Ink.
1	♂ 30	Ak.Virus- hepatitis	SGOT 737, SGPT 475 Ges.eiw.7,7, 4g%	18,6 $\pm$ 0,1 24,1 $\pm$ 0,15	14,1 $\pm$ 0,7 17,2 $\pm$ 0,2			(+)
2	♂ 23	Ak.Virus- hepatitis	SGOT 1315, SGPT 763 Ges.eiw.7,8g%Alb4,9g%					(+)
3	♀ 25	Postak.V.- hepatitis	SGOT 69, SGPT192, Chol. esterase 130%, GEW.8,2	16,2 $\pm$ 0,55	10,1 $\pm$ 0,15			(+)
4	♂ 42	Chron. Hepatitis	SGOT 288, SGPT212, Ch.- esterase 70%, GEW.6,6 g%, Alb.3,6g%	13,9 $\pm$ 0,2	8,7 $\pm$ 0,0	18/29	16%	65%
5	♂ 38	Chron.- Hepatitis	SGOT 180, SGPT 165, Ges.eiw.6,1g%	8,7 $\pm$ 0,1	5,9 $\pm$ 0,15	21/55	0%	51%
6	♀ 58	Leber- cirrhose	Ges.eiw.5,1 g%, Alk. Phos. 85	11,4 $\pm$ 0,0	7,4 $\pm$ 0,2	15/38	0%	37%
7	♂ 45	Metasta- senleber	SGOT 59, SGPT 64, Ch.- esterase 100%, GEW.7,2g%	20,4 $\pm$ 0,35	14,8 $\pm$ 0,1	42/72	05%	94%
8	♂ 55	Cholangi- tis	Alk.Phos.122, Chol.ase 62%, GEW.6,6g%Alb3,5g%	15,05 $\pm$ 0,1	9,7 $\pm$ 0,3	64/12	0%	84%
9	♂ 56	Cholangi- tis	SGOT 212, SGPT 219, CEW5,90g%, Alb 3,6 g%	13,9 $\pm$ 0,15	8,0 $\pm$ 0,1	55/85	65%	94%
10	♀ 48	Abheilende Cholang.	SGOT 59,5, SGPT 78, Alk Phos.55, LAP 66	37,7 $\pm$ 0,3	26,4 $\pm$ 0,4		(+)	(+)
11	♀ 38	Mech.Gall. gangversch.	Alk.Phos.120, Ges. eiw.7,3 g%	19,0 $\pm$ 0,15	12,1 $\pm$ 0,2		(+)	(+)
12	♂ 36	Echinococ- cus m.l.	SGOT 35, SGPT 22	20,7 $\pm$ 0,3	11,6 $\pm$ 0,0			(+)
13	♀ 51	Chron. Nephritis	Ges.eiw.6,3 g%, Cho- lesterin 209 mg%	14,85 $\pm$ 0,2	10,0 $\pm$ 0,15	37/81	4%	62%
14	♂ 65	Nephrose (Nierenve- nenthrom.	Ges.eiw. 4,2 g% Albumin 1,2g%, Cho- lesterin 300mg%	37,8 $\pm$ 0,4	28,1 $\pm$ 0,7	112/ 122	100%	100%
15	♂ 9	Nephrose: membr.Glo- merul.neph.	GEW 4,4g%, Alb.1,9g% Alk. Phos.35, ges. Chol. 49,2mg%, Ch.Est.36,2mg%	36,0 $\pm$ 0,25	27,2 $\pm$ 0,1	120/ 129	96%	100%
16	♀ 42	Lupus Ery- them.visc.	Ges.eiw. 4,9 g%	12,65 $\pm$ 0,1	8,2 $\pm$ 0,0	110/ 120	0%	54%

Ergebnis:

Es ist bekannt, daß die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase ein in der Leber synthetisiertes Enzym ist (9,96,97). Die Schwankungen der LCAT-Aktivität im Vergleich zu den aus dem Krankenblatt entnommenen Veränderungen klinisch chemischer Parameter bei den verschiedenen untersuchten Patienten lassen Rückschlüsse auf die Natur des Leberenzyms zu:

- a) Hohe SGOT und SGPT-Werte gehen nicht mit einer Erhöhung der LCAT-Aktivität einher: diese kann leicht erhöht (Virushepatitis) normal oder sogar erniedrigt sein (chron. Hepatitis).
- b) Die LCAT-Aktivität erhöht sich auch nicht parallel mit der Aktivität der alkalischen Phosphatase (Cholangitis, Gallengangsverschluß) und kann bei niedriger alkalischer Phosphatase hoch sein (Nephrose).
- c) Der Gesamteiweißgehalt und der Albumingehalt im Serum als globaler Ausdruck der funktionellen Lebenssynthesekapazität zeigen bei den Lebererkrankungen deutliche Paralleltät zur LCAT-Aktivität. Bei den Nephrosen ist im Gefolge vor allem des Albuminverlustes die Syntheseleistung der Leber für bestimmte Proteine erheblich gesteigert: dies ist neben dem Albumin bekannt für die Lipoproteine (hohe Cholesterinwerte) und für die Serumcholinesterase (91,98). Im Gegensatz zum Albumin gehen diese Proteine nicht durch die Niere verloren, was einen Anstieg ihrer Konzentration im Serum zur Folge hat (99-102). Die hohe Aktivität der LCAT im Nephrosenserum weist auf einen ähnlichen Entstehungsmechanismus hin.

3) Untersuchung der Korrelation von ^{32}P -Lysolecithinzunahme und Senkungshemmung

Die Fälle, bei denen gleichzeitig mit der ^{32}P -Lysolecithinzunahme die Senkungshemmung nach Inkubation mitbestimmt worden war (s. Versuche IV 4, V 1, V 2) wurden daraufhin untersucht, ob sie, wie vermutet, eine positive von Null signifikant verschiedene Korrelation aufweisen. Als Maß für die Senkungshemmung wurde die jeweilige Summe der prozentualen Hemmwerte nach 3- und 6-stündiger Inkubation genommen.

Zahl der untersuchten Fälle $n = 37$

Korrelations-
koeffizient $r = \frac{\text{Kovarianz (Lysolec.zunahme, Senk.hemmng.)}}{\sqrt{\text{Varianz(LysoL.zun.)} \cdot \text{Varianz(Senk.hmg.)}}}$

$$r = \frac{5188}{\sqrt{98079 \cdot 994}} = 0,5261 \text{ (Signifikanzschwelle } 0,4182)$$

Der Wert $r = 0,5261$ für den Stichproben-Korrelationskoeffizienten liegt über der Signifikanzschwelle $r = 0,4182$ bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% (94). ^{32}P -Lysolecithinzunahme und Senkungshemmung zeigen bei den untersuchten Stichproben eine positive von Null signifikant ($P = 99\%$) verschiedene Korrelation.

4) Untersuchung der Korrelation von ^3H -Cholesterinesterentstehung und Senkungshemmung

Zur Untersuchung der Korrelation von ^3H -Cholesterinesterentstehung und Senkungshemmung wurden die gleichen Fälle wie in Abschnitt V3 untersucht. Lediglich die an Schwangeren gewonnenen Ergebnisse wurden in die Korrelationsberechnung nicht mit einbezogen, da die Schwangeren veränderte Lysolecithinaseaktivität aufweisen (s. Versuche IV2 u. IV4).

Zahl der untersuchten Fälle $n = 24$

Korrelations-
koeffizient $r = \frac{8209}{\sqrt{67907 \cdot 1320}} = 0,867 \text{ (Signifikanzschwelle } 0,513)$

Die ^3H -Cholesterinesterentstehung und damit die LCAT-Aktivität ist positiv mit der Senkungshemmung korreliert. Der Korrelationskoeffizient liegt mit $r = 0,867$ über dem tabellierten r -Wert = 0,513. Damit ist der aus den Stichproben errechnete Korrelationskoeffizient signifikant von Null verschieden ($P = 99\%$).

5) Untersuchung der Hemmung der Blutkörperchensenkung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Bei verschiedenen Blutspenderkollektiven wurde die Hemmung der Blutkörperchensenkung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bestimmt und die Mittelwerte der jeweiligen Kollektive graphisch dargestellt:

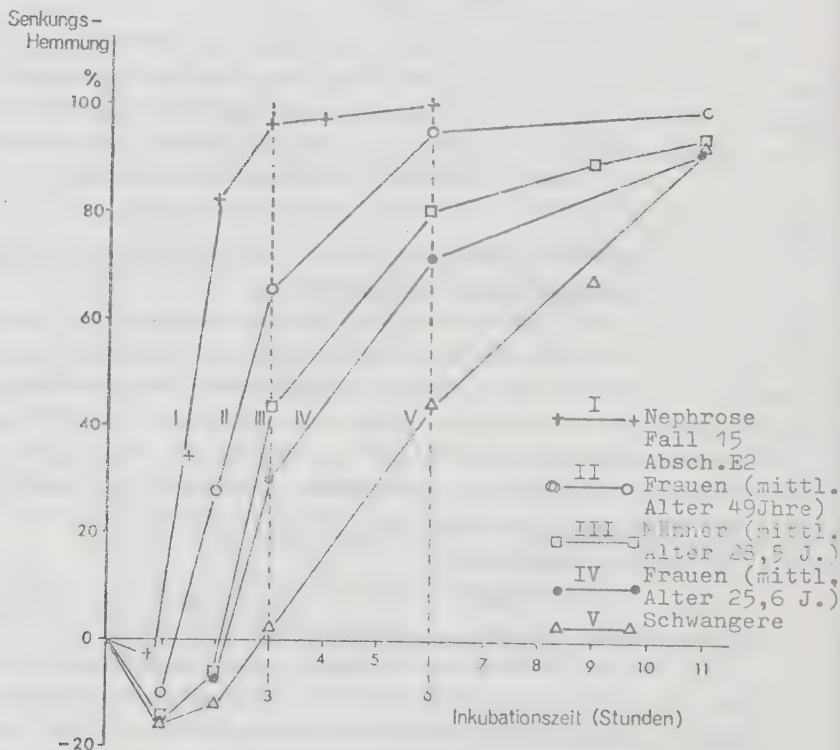


Abb. 23: Senkungshemmung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (II bis V: Mittelwertskurven)

Tabelle 7: Mittelwert und Standardabweichung der Blutkörperchensenkungshemmung bei verschiedenen Blutspenderkollektiven:

Untersuchte Gruppe	Zahl der untersuchten Personen	Senkungshemmung nach 3h Inkubation	Senkungshemmung nach 6h Inkubation
Männer (mittl. Alter 28,5 J.)	12		
Mittelwert		43,8 %	80 %
Standardabweichung s		$\pm$ 36,3 %	$\pm$ 8,66 %
Frauen (mittl. Alter 25,6J.)	10		
Mittelwert		29,9 %	70,8 %
Standardabweichung s		$\pm$ 25,6 %	$\pm$ 26,9 %
Frauen (mittl. Alter 49,5J.)	8		
Mittelwert		65 %	95 %
Standardabweichung s		$\pm$ 25,08 %	$\pm$ 3,6 %
Schwangere	13		
Mittelwert		2,3 %	43,8 %
Standardabweichung		$\pm$ 6,5 %	$\pm$ 25,8 %

Ergebnis:

- a) Die Kurven der Senkungshemmung bei den verschiedenen Kollektiven verlaufen S-förmig mit einer initialen Senkungsbeschleunigung. Dies entspricht dem Kurvenverlauf der Senkungshemmung, den man erhält, wenn man die Lysolecithinkonzentration im Senkungsansatz durch fraktionierte Lysolecithinzugabe linear ansteigen läßt (103).
- b) Die Mittelwertsunterschiede der verschiedenen Gruppen bei der Senkungshemmung entsprechen den alters-, geschlechts- bzw. schwangerschaftsbedingten Unterschieden, die bei der enzymatischen Cholesterinveresterung und Lysolecithinzunahme festgestellt worden waren (s. Abschn. IV3 u. IV4).

c) Von Bedeutung insbesondere für eine mögliche diagnostische Anwendung des Senkungstestes ist aber die Tatsache, daß die Standardabweichung und damit die Streuung der Einzelwerte innerhalb der Gruppen wesentlich größer ist als beim enzymatischen Test. Dafür gibt es folgende Erklärungen:

1. Die Senkungshemmung wurde an gesunden Blutspendern ausgetestet, deren Blut, ausgenommen das Schwangerenblut, ohne senkungsbeschleunigenden Zusatz nur geringe Blutkörperchen-senkungsgeschwindigkeit aufweist. Ein senkungsbeschleunigender Zusatz (z.B. Dextran) hätte beim Vergleich mit den Senkungs- und Senkungshemmansätzen von beschleunigt senkendem Patientenblut ebenfalls ungleiche Voraussetzungen geschaffen.

2. Die Streuung der Einzelwerte des Senkungstestes sollte erwartungsgemäß größer sein als die beim enzymatischen Test, da für die Senkungshemmung nicht allein die Lysolecithinkonzentration entscheidend ist, sondern noch zusätzliche Faktoren wie die Albuminkonzentration und die Zahl der Erythrozyten im Senkungsansatz eine Rolle spielen.

VI) Untersuchung der LCAT-Aktivität im Serum von drei Patienten mit Tangier-Krankheit (Hyp-alpha-Lipoproteinämie).

Von dieser sehr seltenen Krankheit wurden bisher 11 Fälle beschrieben. Bei den drei bisher in Europa diagnostizierten Fällen (104, 105, 106) konnte das Serum auf die jeweilige LCAT-Aktivität ausgetestet werden. Die Untersuchung dieser hereditären Stoffwechselkrankheit im Zusammenhang mit der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase war von Interesse, weil

- a) die Tangier-Kranken im retikulo-endothelialen System eine exzessive Cholesterinesterspeicherung aufweisen, die zur vergrößerten Leber, Lymphknoten, Milz und Tonsillen führt und vermutlich auch die übrige nicht obligate klinische Symptomatik wie Muskelschwäche, Cornealtrübung, Proteinurie bedingt (104 - 108).
- b) das im Tangier-Serum in extrem vermindelter Menge und zugleich in abnormer Form vorliegende High-Density-Lipoprotein (108) das wichtigste Substrat der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase darstellt.

1) LCAT-Aktivität mit Tangier-Serum als Enzymfraktion

Bei den Tangier-Seren wurden durch Ultrazentrifugation die Lipoproteine entfernt und markiertes Lipoprotein von gesunden Spendern als Substrat verwendet. Die LCAT-Aktivität wurde in der beschriebenen Weise (s. Methoden 10) bestimmt. Als Vergleichskontrolle diente in den Fällen 2) und 3) Serum eines gesunden Spenders, das gleichzeitig mit dem Tangier-Serum abgenommen und unter gleichen Bedingungen transportiert wurde. Im Fall 1) diente Serum von 3 gleichaltrigen Kindern, das am selben Tag wie das Tangier-Blut abgenommen wurde als Vergleichsserum.

Ergebnis:

LCAT-Aktivität

1) Fall A.J. (104, 4 Jahre ♀	50 % der Kontrolle
2) Fall R.E. (105), 43 Jahre ♂	33 % der Kontrolle
3) Fall P.L. (106), 42 Jahre ♂	17 % der Kontrolle

Die Verminderung der LCAT-Aktivität in den Tangier-Seren war so augenfällig, daß sie bereits optisch auf der Dünnschichtchromatographieplatte mit den extrahierten Lipoproteinlipiden als gegenüber dem Kontrollserum stark verminderte Lysolecithi zunahme erkennbar war (Abb. 24).

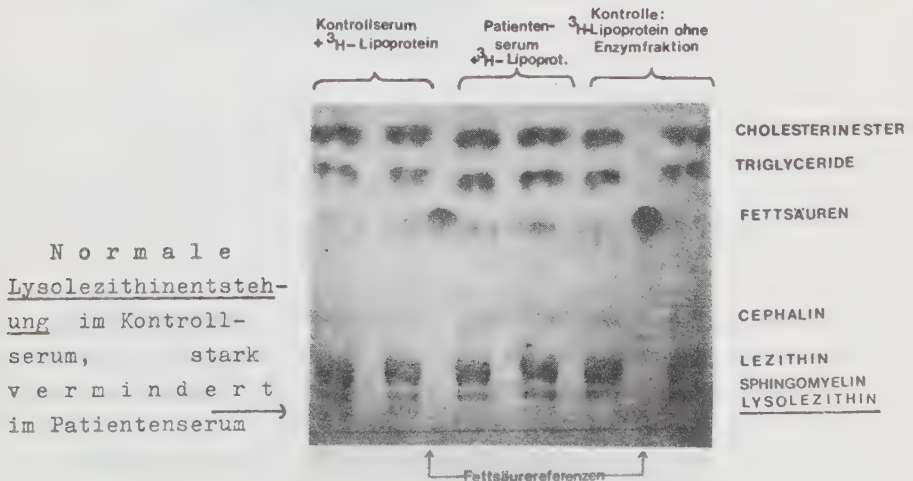


Abb. 24: Serumlipid-Dünnschicht-Chromatogramm (Fall R.E.)

2) LCAT-Aktivität in Normalserum mit Tangier-Lipoproteinen als Substrat

Von einem Tangier-Patienten wurden die Gesamtlipoproteine durch Ultrazentrifugation bei $d = 1,21$ gewonnen und durch Zugabe von ^3H - ^{32}P -Lecithin markiert. Dieses und in gleicher Weise und mit gleicher spezifischer Aktivität markiertes Lipoprotein von gesunden Spendern wurden auf ihre Eignung als Substrat der LCAT-Reaktion ausgetestet. (Abb. 25)

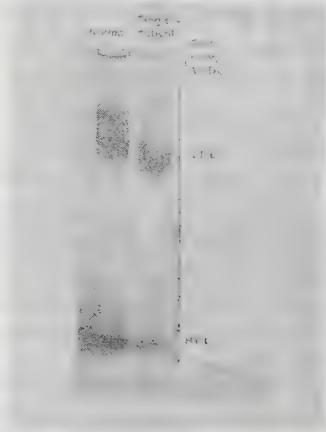


Abb. 25: Serumlipoproteinelektrophorese (Polyacrylamid):
Normale und Tangier-Serumlipoproteine (Fall P.L.)

Die Reaktivität der TANGIER-Lipoproteine als Substrat bei der LCAT-Reaktion betrug 56 % gegenüber Normallipoprotein (Fall P.L.)

Die Elektrophorese der Tangier-Lipoproteine zeigt die für diese Krankheit typische veränderte, breite Beta-Lipoproteinbande (109) und die extrem verminderten Alpha-Lipoproteine, die im allgemeinen bei dieser Krankheit auf etwa $1/12$ der normalen Konzentration verringert sind (107).

E. B E S I R E C H U N G

Die beschriebenen Experimente lassen sich in zwei Gruppen unterteilen:

1. Experimente mit biochemisch orientierter Fragestellung zur Kinetik, Hemmung und Fettsäurebilanz des Lecithinabbaus im Serum.
2. Experimente von überwiegend medizinischem Interesse über die Normalaktivität der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase und Veränderung der Enzymaktivität bei verschiedenen pathologischen Zuständen.

Beiden Gruppen liegt ein gemeinsames Testverfahren zugrunde, das von der Verwendung von doppelmarkiertem Sojabohnenlecithin und der Serumlipidauftrennung durch Zweistufen-Dünnschichtchromatographie ausgeht (s. Abb. 3).

Gegenüber der Bilanzierung der Lecithinabbaureaktionen durch Kombination von Lecithinphosphorbestimmung und Cholesterinesterbestimmung (57,58,61) oder der Verwendung von markiertem Cholesterin zum Verfolgen der LCAT-Reaktion (49,59,60) bietet dieses Testverfahren folgende Vorteile:

- a) Durch Verwendung von Sojabohnen bei der Herstellung von markiertem Lecithin besteht die Möglichkeit, das Glycerophosphorylgerüst (^{32}P) und die Fettsäuren (^3H) getrennt zu markieren. Dadurch können sowohl die Abbaustufen des Lecithins als auch der Transfer der Fettsäuren vom Lecithin zum Cholesterin und die hydrolytische Fettsäure-Freisetzung direkt verfolgt werden. Zusätzlich zur Fettsäurebilanz des Lecithinabbaus können damit verschiedene Abbauwege differenziert erfaßt werden.
- b) Unter Ausnützung der sehr stoffwechselaktiven Keimphase der Sojabohnen kann eine hohe spezifische Aktivität des Lecithins erzielt werden. Der ^{32}P -Einbau verläuft über einen weiten Bereich linear zur eingesetzten Radioaktivitätsmenge (62). Durch eine hohe radioaktive Markierung der Lecithinuntereinheiten können die Reaktionen mit großer Genauigkeit verfolgt werden und die zur Erfassung von unterschiedlichen Enzymaktivitäten notwendigen Inkubationszeiten verkürzt werden.

- c) Besonders günstig sind die Voraussetzungen für eine Fettsäurebilanz zusätzlich durch die dünnschichtchromatographische Auftrennung von Lecithin, Lysolecithin, freien Fettsäuren und Cholesterinestern. Dadurch kann die Bestimmung dieser Lipide, die alle Zustandsformen der Lecithinfettsäuren darstellen, aus einem einzigen Ansatz erfolgen. Damit fallen Fehler durch unterschiedliches Pipettieren der Ansätze und durch unterschiedliche Extraktion der Lipidkomponenten weg. Die Lipidtrennung erfolgt unter gleichen Chromatographiebedingungen (gleicher Auftragefehler) und die Bestimmung der Einzelkomponenten geschieht allein durch radioaktive Zählung (keine Bilanzfehler durch unterschiedliche Bestimmungsmethoden der einzelnen Lipide).

GLOMSET fand beim Vergleich der Lecithinabnahme und der Zunahme an Cholesterinestern im inkubierten Humanserum durch nicht radioaktive Lecithinphosphor- und Cholesterinbestimmung eine annähernd molare Entsprechung von Lecithinabnahme und Cholesterinesterzunahme (57,58).

Die Ergebnisse der Fettsäurebilanz des Abbaus von markiertem Lecithin in Serum zeigen, daß zumindest beim Abbau von Sojabohnenlecithin neben der durch die Lecithin-Cholesterinacyltransferase verursachten Lecithinabnahme noch eine weitere zusätzliche hydrolytische Aktivität nachweisbar ist, die für 10 bis 14 % des Gesamtabbaus verantwortlich ist. Diese hydrolytische Aktivität, die nahezu identisch ist mit dem Lecithinabbau in hitzeinaktiviertem Serum, kann durch eine hitzestabile Lecithinase verursacht sein:

Von ZIEVE und VOGEL ist in Humanserum eine Lecithinaseaktivität nachgewiesen worden, die bis zu einer Temperatur von 80° völlig hitzestabil war (63,64). Diese Lecithinase zeigte im Serum Gesunder nur geringe Aktivität, stieg aber im Serum von Patienten mit akuter Pankreatitis in guter Korrelation mit erhöhten Serumlipase- und -amylasewerten bis auf den 20-fachen Wert der Normalaktivität an. Zusätzlich zeigte sie neben der für die menschliche Pankrealecithinase bekannten Hitzestabilität (65, 66, 67) gleiche

pH-Optimum sowie gleiches Hemm- und Aktivierungsverhalten wie die Pankreaslecithinase. Als Substrat für die mit großer Sicherheit pankreatische, hitzestabile Lecithinase im Serum wurde nicht endogenes Lipoproteinlecithin sondern synthetische Lecithinemulsionen verwendet.

Neueste Arbeiten von UTHE und MAGEE (68,69) zeigen, daß Serumlipoproteine als Substrat für die menschliche Pankreaslecithinase ungeeignet sind und daß bereits geringe NaCl-Konzentrationen einen hemmenden Effekt auf das Enzym ausüben. Nach IBRAHIM et al (70) soll die Pankreaslecithinase Lipoproteine nur unter Deoxycholateinfluß angreifen.

Die Hitzestabilität der nicht identifizierten Lecithinaseaktivität im Serum neben der LCAT-Aktivität legt eine Identität mit der beschriebenen Pankreaslecithinase nahe. Es ist anzunehmen, daß dabei nur das im Lauf der Präinkubation nicht an die Serumlipoproteine assoziierte Sojabohnenlecithin abgebaut wird, während das an die Lipoproteine gebundene Lecithin ausschließlich über die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase metabolisiert wird.

Die gewonnenen Ergebnisse haben ausschließlich für die Enzymaktivitäten im Nüchternserum Gültigkeit. Im Postprandialserum ist parallel zur Aktivierung der Lipoproteinlipase mit dem zusätzlichen Wirken der hitzestabilen (53) Postheparinlecithinase zu rechnen.

Für die Hemmung der Blutkörperchensenkung durch das enzymatisch entstehende Lysolecithin läßt sich ein früher vermutetes (71) quantitativ bedeutsames Enzym neben der LCAT mit Sicherheit ausschließen. Die Untersuchung von Blutplasma von Patienten mit akuter Pankreatitis lassen eine durch die erhöhte pankreatische Lecithinaseaktivität unbeeinflusste Senkungshemmung erwarten.

Die quantitativen Unterschiede im Abbau des radioaktiven Sojalecithins bzw. Lysolecithins gegenüber dem nativen Lecithin und Lysolecithin (s. Abb. 8) sind, nachdem exogenes und endogenes Lecithin sich an den Lipoproteinen vollständig

ins Gleichgewicht gesetzt haben, auf Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide zurückzuführen. Die Fettsäurespezifität der Abbaureaktionen läßt sich durch einen Vergleich der an den Reaktionen beteiligten Fettsäuren nach Literaturangaben in Tabelle 8 demonstrieren:

Tabelle 8: Nach Position, Kettenlänge u. Zahl der Doppelbindungen aufgeschlüsselte prozentuale Fettsäurezusammensetzung von:

	16:0	18:0	16:1	18:1	20:1	18:2	20:2	18:3	20:3	22:3	20:4
<u>Serumlecithin</u>											
C2-Position											
n. MARAI (72)	4,8	1,0	1,2	1,7	0,8	32,2	9,9		6,9	1,5	21,0
<u>Sojalecithin</u>											
C2-Position											
n. HÖLZL (73)	8,0			5,0		38,0		2,0			
<u>Serumchol.- ester</u>											
n. SCHRÄDE (74)	12,1	2,0	5,8	18,9		47,1					5,0
<u>Serumlecithin</u>											
C1-Position	59,0	26,0	1,7	6,9		3,0					
<u>Sojalecithin</u>											
C1-Position	28,0	6,0		41,0		24,0					

Bringt man diese Zusammenstellung in Zusammenhang mit den gewonnenen Ergebnissen lassen sich folgende Aussagen über die Fettsäurespezifität von Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase und Lysolecithinase machen:

- a) Die in C2-Position häufigsten Fettsäuren des Serumlecithins sind Linolsäure (18:2) und Ölsäure (18:1). Sie werden auch quantitativ am meisten in Serumcholesterinester eingebaut, wobei eine besondere Bevorzugung der Linolsäure (18:2) zu beobachten ist. Bei der Ratte ist eine ähnliche Spezifität für Arachidonsäure (20:4) bekannt (8).

Auch beim Sojabohnenlecithin sind Ölsäure und Linolsäure die quantitativ bedeutendsten C2-ständigen Fettsäuren. Dies erklärt die im Gleichgewichtszustand ähnlichen Abbauraten von 1,24 : 1 für Serumlecithin gegenüber Sojabohnenlecithin. Der bestehende geringe Unterschied läßt sich durch das Überwiegen der Ölsäure sowie das Fehlen der Arachidonsäure im Sojalecithin erklären.

- b) Im Gegensatz zur C2-Position ist das Spektrum der Fettsäuren von Serum- und Sojabohnenlecithin in C1-Stellung sehr verschieden. Hierdurch erklärt sich auch die unterschiedliche Abbaugeschwindigkeit des markierten und des unmarkierten Lysolecithins durch die Serumlysolecithinase. Im Sojabohnenlecithin überwiegen die ungesättigten Fettsäuren Ölsäure und Linolsäure mit zusammen 65 %, während diese beiden im Serumlecithin nur 10 % ausmachen und dafür die gesättigten Fettsäuren Palmitinsäure (16:0), und Stearinsäure (18:0) zusammen 85 % der gesamten C1-ständigen Fettsäuren ausmachen. Aus der beobachteten Akkumulation des Sojalysolecithins kann man schließen, daß die Lysolecithinase im Gegensatz zur Acyltransferase bevorzugt gesättigte Fettsäuren vom Typ der Palmitin- und Stearinsäure umsetzt. Die Beobachtungen über die unterschiedlichen Substratspezifitäten von Acyltransferase und Lysolecithinase können auch von pharmakologischem Interesse sein, insbesondere bei einer möglichen therapeutischen parenteralen Applikation von Sojabohnenlecithin. Die Versuche in vitro lassen vermuten, daß parenterale Zufuhr von Sojabohnenlecithin durch die nahezu normale Metabolisierung in der ersten Abbaustufe und einen auf die Hälfte des Normalen reduzierten weiteren Abbau einen erhöhten Lysolecithinspiegel im Blut entstehen lassen.
- Von Bedeutung in diesem Zusammenhang sind die neueren Befunde, die einen erhöhten Serumlysolecithinspiegel als einen der auslösenden Faktoren bei der Entstehung der Atherosklerose erscheinen lassen (75-78).

Bei dem Versuch, die Bindung des zugefügten markierten Lecithins an die Serumlipoproteine durch Kombination von Serum-Elektrophorese und Autoradiographie nachzuweisen, konnten überraschend Hinweise auf physikochemische Änderungen der Substratlipoproteine unter dem Einfluß des enzymatischen Lecithinabbaus gefunden werden: es konnte eine als Substrat-Produkt-Umwandlung gedeutete Umverteilung des radioaktiven Lecithins innerhalb der HDL-Untergruppen demonstriert werden (s. Abb.9 und 11).

Bereits 1961 fand ONCLEY (79) Hinweise, daß die High-Density-Lipoproteine keine einheitliche Proteingruppe darstellen. JANSSEN, KENNEDY und GLOMSET gelang 1966 durch Ultrazentrifugation von inkubiertem Serum und anschließender Auftrennung einer Sephadex G-200-Säule eine Auftrennung in HDL-Untereinheiten verschiedener Lecithin-Cholesterin- und Cholesterinesterzusammensetzung (80). Als Ursache für die Klassenbildung nehmen diese Autoren die enzymatische Wirkung der Acyltransferase an. Der Verlust von polaren Lipiden (Lecithin) bei der Inkubation soll eine Aggregation von HDL-Untereinheiten erleichtern, was sich in einer zunehmenden Größe der HDL-Komplexe bei fortschreitender Inkubation niederschlägt.

Dieses Konzept deckt sich sehr gut mit den jetzt bei der Acrylamidelektrophorese gewonnenen Ergebnissen. Die geringere elektrophoretische Wanderungsweite der Produkt-HDL gegenüber den Substrat-HDL kann nur auf einer vermehrten Molekülgröße und nicht auf einer verringerten Ladung beruhen. Für die Produkt-HDL wäre im Gegenteil von der elektrischen Ladung her zu erwarten, daß ihre elektrophoretische Beweglichkeit wegen der vermehrten Konzentration von freien Fettsäuren im Serum bei Inkubation (s. Abb. 16) nicht ab- sondern zunimmt.

Eine Zunahme der elektrophoretischen Beweglichkeit von HD- und LD-Lipoproteinen nach Lagerung oder Inkubation von Serum ist seit langem bekannt (81,82).

Der Vorteil der neuen Darstellungsweise liegt darin,

daß hier die Möglichkeit der Bildung von HDL-Untergruppen als Ergebnis eines Artefaktes weitgehend ausgeschlossen ist. Der Präparationsgang bei JANSSEN et al (80) umfaßt Säulenchromatographie, Dialyse und Ultrazentrifugation und erstreckt sich über 2-3 Tage. Es ist bekannt, daß Lagerung und vor allem Ultrazentrifugation bei hoher Salzkonzentration bei HD-Lipoproteinen Präparationsartefakte erzeugen (80,83).

Im vorliegenden Fall wurde dagegen das Serum sofort nach der Inkubation ohne jede weitere Manipulation durch Acrylamidelektrophorese aufgetrennt und die Lipoproteinklassen erst nachträglich durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Der Vergleich der elektrophoretischen Wanderungsweiten von durch Ultrazentrifugation getrennt gewonnenen Lipoproteinklassen (s. Abb. 10) läßt zusätzlich darauf schließen, daß es sich bei dem Substrat-HDL um HDL-III und beim Produkt-HDL um HDL-II handelt. Damit können aus dem autoradiographischen Bild jüngste Befunde von FIELDING et al (84) bestätigt werden, die zum ersten Mal zeigen, daß HDL-III als bevorzugtes Substrat der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase mit hoher Aktivität umgesetzt wird, während bei HDL-II als Substrat nur geringe Enzymaktivität nachweisbar ist.

Es konnte gezeigt werden, daß die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase wie bakterielle Phospholipasen (51) auf die Änderung der elektrischen Ladung ihres Substrates mit einer Änderung der Enzymaktivität reagieren.

Aus der Literatur ist bekannt (85,86), daß die Acyltransferase in Serum durch Zusatz von Phospholipase A (*Crotalus adamanteus*) vollständig gehemmt werden kann. Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß diese Hemmung neben dem Verbrauch des Substratlecithins auch durch eine Erhöhung der Konzentration der freien Fettsäuren mit einer daraus folgenden Änderung der elektrischen Ladung der Substratlipoproteine möglich ist. Die Lipoproteine, insbesondere die HDL, be-

sitzen zwar weniger primäre, aber dafür mehr sekundäre Fettsäurebindungsarten als das Albumin (87), das daher bei höheren Fettsäurekonzentrationen bald abgesättigt ist. Die Lipoproteine reagieren deshalb auf höhere Fettsäurekonzentrationen mit einer Änderung der elektrophoretischen Beweglichkeit (88, 89).

Die Beeinflussung der LCAT-Aktivität über die Konzentration der freien Fettsäuren im Blut erschien als ein unter physiologischen Bedingungen möglicher Hemmungsmechanismus besonders untersuchenswert:

- a) Durch Aktivierung der körpereigenen Lipoproteinlipase und Postheparinlecithinase konnte parallel mit einer Erhöhung des Fettsäurespiegels eine partielle Hemmung der Acyltransferase erzielt werden. Dies ist unter physiologischeren Bedingungen eine Entsprechung der zitierten Hemmung durch exogene Phospholipase A.
- b) Allein schon körperliche Arbeit läßt einen Fettsäurespiegel (90) entstehen, der ebenso hoch ist, wie der, der bei den vorliegenden in vitro Versuchen eine Hemmung bis zu 30 % hervorrief (s. Abb. 13). Auch bei Insulinmangeldiabetes, Adipositas, Hyperthyreose, verschiedenen Formen der Hyperlipoproteinämie und gegen Ende der Schwangerschaft besteht ein zum Teil erheblich erhöhter Fettsäurespiegel im Serum (91).
- c) In einer jüngst erschienenen Arbeit von LIPSON und NAIMI (92) wird der Effekt der Fettsäurefreisetzung durch Noradrenalininfusion bei Hunden auf die elektrophoretische Beweglichkeit (Papierelektrophorese) von HDL-Untereinheiten untersucht. Die Änderung der elektrophoretischen Beweglichkeit der High-Density-Lipoproteine bei dieser in vivo Erhöhung der Fettsäurekonzentration im Serum stimmt prinzipiell mit der von uns bei in vitro Zugabe von Fettsäuren (s. Abb. 12) gefundenen überein. Die Schwelle für Änderungen in der elektrophoretischen Beweglichkeit der HDL-Untereinheiten liegt mit 1,2 mVal/l bei den untersuchten Hundeseren noch wesentlich niedriger als bei den eigenen Untersuchungen an Humanserum.

Die Untersuchung der individuellen Veresterungsaktivität bei einem größeren Kollektiv von klinisch gesunden Blutspendern war zunächst als Basis gedacht, um überhaupt die Enzymaktivität der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase bei Gesunden gegenüber Veränderungen bei Krankheitszuständen abgrenzen zu können. Die Aufschlüsselung der gewonnenen Ergebnisse nach Alter und Geschlecht führte zur Aufdeckung von statistisch gesicherten geschlechts- und altersabhängigen Unterschieden. Über alters- und geschlechtsabhängige Unterschiede in der Cholesterinveresterung im Serum existieren bisher nur wenige und widersprüchliche Untersuchungen. Die Widersprüche sind auf die verschiedenen zum Teil unbefriedigenden Untersuchungstechniken zurückzuführen. Folgende Testmethoden zur Messung der LCAT-Aktivität im Serum von Menschen, Ratten, Hunden und Affen unter Normalbedingungen oder bei pathologischen Zuständen sind beschrieben worden:

- 1) Mehrtägige Inkubation von unfraktioniertem, unmarkiertem Serum oder Plasma (109, 110, 111, 115, 116)
- 2) Inkubation von Serum oder Plasma, dem komplex an Albumin gebundenes radioaktiv markiertes Cholesterin zugesetzt wurde (118, 119)
- 3) Verwendung von unfraktioniertem Plasma oder Serum als Enzymfraktion und von hitzeinaktiviertem Plasma (113) oder Lipoproteinen (112) mit (112, 117) oder ohne ^{14}C -markiertem Cholesterin (114).

Gegenüber der in der vorliegenden Arbeit benutzten Methode der strengen Trennung von Enzym- und Substratfraktion und der Verwendung eines standardisiert präparierten lecithin-doppelmarkierten Substratlipoproteins weisen die zitierten Methoden folgende Nachteile auf:

- keine (Methode 1) oder unvollständige (Methoden 2 und 3) Trennung von Enzym- und Substratfraktion.
- ungleiche Substratzusammensetzung (Methode 1) durch geschlechts- und alters- (34, 35) oder krankheitsbedingte (36) Unterschiede in der Lipoproteinkonzentration.
- ungleiche Reaktivität des Substrats bei Verwendung von hitzeinaktiviertem Plasma oder Lipoprotein (Methode 3).

- lange Inkubationszeit (Methode 1).

- mit keiner der drei Methoden kann eine die wahre Cholesterinveresterungsaktivität verfälschende Cholesterinesterhydrolaseaktivität im Serum erfaßt werden, die bei pathologischen Zuständen mit massivem Zelluntergang vom Gewebe ins Blut gelangen könnte. Eine solche Cholesterinesterhydrolase ist für Leber- und Pankreasgewebe nachgewiesen worden (120, 121).

WAGNER und POINDEXTER (109) fanden, daß nach 3-tägiger Inkubation von Plasma (Methode 1) bei 17-20-jährigen Frauen mehr Cholesterin verestert wurde als bei nicht näher bezeichneten Frauen "mittleren Alters". GHERONDACHE (110) wies nach 2-tägiger Seruminkubation (Methode 1) bei 20-jährigen Frauen eine stärkere Veresterung als bei Frauen zwischen 40 und 99 Jahren nach. Er fand außerdem beim Vergleich der Veresterung zwischen Männern und Frauen bei gleichen Versuchsbedingungen keinen signifikanten geschlechtsabhängigen Unterschied.

Bei der Interpretation dieser Befunde müssen die außerordentlich langen Inkubationszeiten in Betracht gezogen werden, die weit außerhalb des Bereiches liegen, in dem die Cholesterinesterzunahme linear zur Inkubationszeit verläuft. Deshalb ist anzunehmen, daß bei diesen Versuchen mehr Unterschiede bestimmt wurden, die durch die verschiedene Substratlipoproteinmenge und -zusammensetzung als durch unterschiedliche Enzymaktivität bedingt waren.

Für diese Deutung sprechen die Befunde über die Konzentrationsunterschiede der Lipoproteine im Serum von Männern und Frauen. Übereinstimmend wurde von BARCLAY et al (34, 122), DELALLA (123) und SKIPSKI et al (124) nachgewiesen, daß die Konzentration der High-Density-Lipoproteine bei Frauen vor der Menopause signifikant höher ist als bei Männern. BARCLAY (122) konnte zusätzlich eine Korrelation zwischen HDL-Konzentrationsschwankungen bei Frauen mit dem menstruellen Zyklus nachweisen, wobei das Maximum der HDL-Konzentration mit der maximalen Östrogenproduktion

zusammenfiel. Die Konzentration der High-Density-Lipoproteine bei Frauen nach der Menopause nähert sich den Werten der Männer (123).

Auch bei Versuchstieren wurden konträre Ergebnisse bei der Suche nach geschlechtsabhängigen Unterschieden bei der Cholesterinveresterung im Serum gefunden: SUGANO et al (113) fand bei der Untersuchung von jungen Hühnern und Hähnchen bei den männlichen Tieren eine signifikant höhere Veresterungsrate. Bei diesen Versuchen wurde hitzeinaktiviertes Serum mit ^{14}C -markiertem Cholesterin als Substrat verwendet (Methode 2). Dagegen fanden AFTERGOOD und ALFIN-SLATER (125) bei Ratten bei weiblichen Tieren eine deutlich verstärkte Veresterung im Plasma gegenüber den erwachsenen männlichen Tieren. Die Autoren führen diese nach der Methode 1 (jedoch mit nur 5-stünd. Ink.) gewonnenen Ergebnisse selbst auf Änderungen in der Substratlipoprotein-zusammensetzung und nicht auf Änderung der Aktivität der LCAT zurück (126). Die gleiche Deutung geben sie nach derselben Methode demonstrierten Befunden, wonach Ratten unter hohen Dosen von oralen Kontrazeptiva vermehrt Cholesterin im Plasma verestern (127). Über eine Steigerung der Biosynthese des Cholesterins unter dem Östrogeneinfluß (128) wird der Gehalt der Lipoproteine an Cholesterin verändert (129). RAZ (130) und MONGER et al (112) haben nachgewiesen, daß die Cholesterinkonzentration im Serum und in den Lipoproteinen die LCAT-Aktivität stark beeinflussen kann. Die Unterschiede in der Veresterung von Substraten verschiedener Herkunft (Männer, Frauen, Schwangere) finden sich in qualitativ gleicher Weise in der vorliegenden Arbeit (s. Abschn. IV2). Doch hier wurden im Humanserum stärkere zum Teil gegenläufige geschlechts- und hormonabhängige Unterschiede in der Enzymaktivität der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase festgestellt. In diesem Zusammenhang könnte die angeführte durch hohe Kontrazeptivagaben ausgelöste gesteigerte Cholesterinveresterungsrate bei Ratten in Einklang gebracht werden mit den vorliegenden Befunden über

die gesteigerte LCAT-Aktivität im Serum von schwangeren Frauen. Dieser Zusammenhang muß aber, da weitere Untersuchungen zu diesem Thema bei schwangeren Frauen fehlen, vorläufig hypothetisch bleiben.

Dagegen lassen sich für die gefundene gesteigerte Lysolecithinaseaktivität im Serum von Schwangeren aus der Literatur gute Hinweise finden. Die gesteigerte Lysolecithinaseaktivität erklärt den seit langem bekannten Befund, daß im Blut von Schwangeren der Lysolecithinspiegel auffällig niedrig ist (131, 132). Von PORTMAN et al (133) konnte im Blut von schwangeren Rhesusaffen frühestens 42 Tage nach Schwangerschaftsbeginn eine Lysolecithinase placentaren Ursprungs nachgewiesen werden. Auch für die vermehrte Lysolecithinaseaktivität beim Menschen könnte ein Placentaenzym verantwortlich sein. Bei Versuchstieren ist die zentrale Stellung der Placenta im Lecithinstoffwechsel des Föten bekannt (134). In diesem Zusammenhang ist interessant, daß Lysolecithin neben seiner bekannten cytolytischen Aktivität auch Vasopressin- und Oxytocin-Wirkung zeigt (135).

Neben der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase im Serum sind beim Menschen in der Darmmukosa (135), der Nebennierenrinde (136) und in der Lebermikrosomenfraktion (137) weitere mit der LCAT nicht identische cholesterinveresternde Enzymaktivitäten nachgewiesen worden. Für die physiologische Bedeutung der LCAT als wichtigstem Produzenten der Serumcholesterinester sprechen folgende Befunde:

- Evisceration (137), Hepatektomie (138) und Teilhepatektomie (139) führen bei der Ratte zu einem raschen Abfall sowohl der Cholesterinester im Serum als auch der cholesterinveresternden Enzymaktivität im Serum.

- PORTMAN und SUGANO (140) konnten nachweisen, daß die errechnete in vivo Gesamtcholesterinveresterung sich deckt mit der bei Inkubation von frischem Humanplasma in vitro tatsächlich erhaltenen Cholesterinveresterung.

NORUM und GJONE (141-143) fanden bei drei Geschwistern in Norwegen ein völliges Fehlen der LCAT zusammen mit einer starken Erniedrigung der High-Density-Lipoproteine. Das Serum dieser Patientinnen zeichnete sich durch ein fast völliges Fehlen der Cholesterinester aus: weniger als 10 % des Gesamtcholesterins lag in veresterter Form vor.

Die angeführten Hepatektomie- und Eviscerationsexperimente (137, 138) zeigen, daß die LCAT in der Leber synthetisiert und ins Serum sezerniert wird und daß die LCAT im Serum eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt. Dieser Befund wird auch von neuesten Ergebnissen bei der Enzymreinigung unterstützt (84). Dies im Zusammenhang mit der Bedeutung der LCAT für die Cholesterinester im Serum läßt bei Lebererkrankungen typische Befunde erwarten: Die Veränderung des Cholesterinesterquotienten bei verschiedenen Lebererkrankungen ist ein klinisch lange bekanntes Phänomen (144), wobei besonders der "Cholesterinestersturz" bei der akuten oder perakuten Leberdystrophie klinische Beachtung gefunden hat.

In Übereinstimmung mit den vorliegenden Untersuchungsergebnissen wurden von anderen Untersuchern folgende Änderungen der LCAT-Aktivität bei Krankheitszuständen gefunden:

TURNER et al fanden bei akuter Hepatitis normale bis erniedrigte Enzymaktivität, offenbar abhängig vom Zeitpunkt der Krankheit, mit erniedrigter Aktivität zu Beginn der Erkrankung.

Ferner fanden sie stets erniedrigte Veresterung bei herabgesetzter totaler Lebersynthesekapazität infolge chronischer Hepatitis, Zirrhose, Lebermetastasierung und Morbus Hodgkin. (115, 116). Leider wurden diese Untersuchungen wie auch die folgenden von MENDOZA und DIAZ (111) nach der Methode 1 durchgeführt, so daß sie nur bedingt vergleichbar sind.

MENDOZA und DIAZ untersuchten Patienten mit Verschlußikterus und fanden sowohl erhöhte als auch erniedrigte Veresterungswerte. Bei Patienten mit Kala-Azar, einer Krankheit, die auch die Leberfunktion beeinträchtigt, fanden sie erniedrigte Veresterung.

KATTERMANN und WOLFRUM fanden nach experimentell erzeugter Hepatitis und Cholestase (118) bei der Ratte unter Verwendung der Methode 2 bei Cholestase eine leichte Erhöhung der LCAT-Aktivität und bei der Galaktosamin-Hepatitis eine starke Verminderung der Enzymaktivität, die parallel zur hepatozellulären Schädigung verlief.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Erhöhung der LCAT-Aktivität bei zwei Fällen von nephrotischem Syndrom wird gestützt durch Befunde von McKENZIE und NESTEL (145), die bei nephrotischem Syndrom einen erhöhten Durchsatz der Plasma-cholesterinester festgestellt haben.

EISENBURG (146) unterscheidet bei der Enzymdiagnostik von Lebererkrankungen drei Enzym- bzw. Proteingruppen:

- Indikatorenzyme (z.B. SGOT, SGPT, LDH)
- Exkretionsenzyme (z.B. Alk.Phosphatase)
- Sekretionsenzyme bzw. -proteine (z.B. Cholinesterase, Gerinnungsfaktoren II, V, VII, VIII, X, Albumin).

Nach den Ergebnissen von Abschnitt V/2 (Tabelle 6) und den angeführten Befunden anderer Untersucher ist die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase dem Typ der Lebersekretionsenzyme zuzuordnen. Von der Cholinesterase und dem Albumin unterscheidet es sich durch seine wesentlich kürzere Halbwerteszeit im Blut.

Über Veränderungen der Cholesterinveresterung unter dem Einfluß maligner Geschwulsterkrankungen liegen neben den eigenen Untersuchungen nur wenige weitere Befunde vor: In der bereits zitierten Arbeit von TURNER et al (116) wird über eine verminderte Cholesterinveresterung bei Morbus Hodgkin und bei Metastasen berichtet.

Indirekte Hinweise auf eine mögliche tumorbedingte Verminderung der LCAT-Synthese in der Leber ergeben sich aus folgenden Arbeiten: In einem ähnlich wie dem eigenen zusammengesetzten Krankengut berichten PIUKOVICH et al (147) über "Quantitative Veränderungen von Serumeiweißen bei malignen gynäkologischen Geschwülsten". Sie fanden bei einer nicht signifikanten Abnahme der Serumgesamteiweiß-Konzentration eine signifikante Abnahme der Serumalbumin-Konzentration und eine Zunahme des Gehaltes an γ -Globulin.

ALPERN (148) fand bei Carcinompatienten und bei Kaninchen mit transplantierten Tumoren (Brown-Pearce-Tumor) eine erniedrigte Cholinesterase-Aktivität im Blut.

BARCLAY et al (34, 156, 157) berichten über eine hoch signifikante Abnahme der Konzentration des High-Density-Lipoproteins, speziell des HDL-II, bei Kindern mit akuter Leukämie, Frauen mit Mammacarcinom und Männern mit unterschiedlichen neoplastischen Erkrankungen.

Im Anschluß an Untersuchungen von RUHENSTROTH-BAUER (149) veröffentlichten GROSS et al (150) Befunde, wonach die Hemmung der beschleunigten Blutkörperchensenkung nach Wärmeinkubation ("Wärmestabilisierung") bei Tumorkranken signifikant schwächer ist, als bei Patienten mit Senkungsbeschleunigung auf Grund von Entzündungen. Diese aufsehen-erregenden Befunde, die die Möglichkeit einer einfachen Differentialdiagnose zwischen tumor- und entzündungsbedingten hohen Senkungen versprachen, konnten von einer ganzen Reihe von Nachuntersuchern aber nicht bestätigt werden (151-154). Die vorliegenden Untersuchungen ermöglichen eine Deutung der Diskrepanz der Befunde. Am Zustandekommen der Senkungshemmung sind folgende Faktoren beteiligt:

- 1) die Aktivität der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase, als fast ausschließlichen Produzenten des neuentstehenden Lysolecithins. Diese Aktivität variiert alters- und geschlechtsabhängig und ist bei Schwangerschaft und nephrotischem Syndrom erhöht, bei chronischen sowie akuten Erkrankungen, die die Proteinsynthesekapazität der Leber herabsetzen, erniedrigt.
- 2) die Enzymaktivität der Serumlysolecithinase, die etwa die Hälfte des neu entstehenden Lysolecithins zu Glycerophosphorylcholin abbaut. Diese Aktivität ist in der Schwangerschaft erhöht, möglicherweise durch eine zusätzliche Lysolecithinase placentaren Ursprungs.
- 3) die Menge des im Plasma vorhandenen Albumins, da dieses mit der Erythrozytenmembran um die Bindung des entstehenden Lysolecithins konkurriert (103). Die Hypalbuminämie beim nephrotischen Syndrom verstärkt die Senkungshemmung, die bei diesem Krankheitsbild besonders ausgeprägt ist.

- 4) die Zahl der Erythrozyten im Inkubationsansatz. Dies ist ein für die Vergleichbarkeit von Senkungshemmuntersuchungen und die Fehlerstreibreite dieser Methode entscheidender Faktor.

Bei dem untersuchten Kollektiv an Tumorkranken konnte im Mittel gegenüber einer Kontrollgruppe gleichen Alters und gleichen Geschlechts eine signifikante Erniedrigung der LCAT-Aktivität zusammen mit einer entsprechenden Verminderung der Senkungshemmung gefunden werden. Gegenüber den Mittelwerten gesunder gleichaltriger Männer oder jüngerer Frauen bestand jedoch kein Unterschied. Es ist zu vermuten, daß die erwähnten Diskrepanzen bei den Befunden über die Wärmeaktivierung beschleunigter Senkungen durch die geschlechts- und altersabhängigen Schwankungen der LCAT-Aktivität bedingt sind.

Die Werte für die LCAT-Aktivität der tumorkranken Frauen lagen fast ausnahmslos im 2s-Streubereich der Werte für Gesunde gleichen Alters und Geschlechts. Da für den Senkungshemmtest wegen der zusätzlich beteiligten anderen Faktoren die Streubreite der Werte bei Gesunden noch größer als beim LCAT-Test veranschlagt werden muß, ist für den Einzelfall die diagnostische Aussagekraft des Senkungstests sehr zurückhaltend zu beurteilen. Die Frage nach der differentialdiagnostischen Brauchbarkeit dieser Methode sollte unter Beachtung der zusätzlich erkannten Variablen im Rahmen einer größeren klinischen Untersuchung neu gestellt werden.

Die Untersuchung der LCAT-Aktivität in drei Fällen von Tangier-Krankheit ergab eine außerordentlich starke Einschränkung der Cholesterinveresterung im Serum dieser Patienten. Die gilt sowohl für die Aktivität des Patientenserums gegenüber normalem Lipoproteinsubstrat, als auch für die Reaktivität des Tangiersubstratlipoproteins gegenüber normalem Serumenzym.

Die diffuse Speicherung von Cholesterinestern im retikulo-endothelialen System dieser Kranken kann somit nicht auf eine Überproduktion von Cholesterinestern im

Serum zurückgeführt werden. KUMMER et al (104) fanden in dem von ihnen untersuchten Fall von Tangier-Krankheit, dessen Serum auch in der vorliegenden Arbeit untersucht werden konnte (Fall 2), keine über die Norm verkürzte oder verlängerte Halbwertszeit von markiertem Cholesterin im Plasma. Ebenso war die Cholesterinsynthese in den Tonsillen in einem von FREDERICKSON et al (155) untersuchten Fall von Tangier-Krankheit normal. Eine Speicherung infolge vermehrter Synthese von Cholesterinestern ist somit unwahrscheinlich. Die Befunde sprechen vielmehr für die Vermutung von FREDERICKSON (107), daß durch das Fehlen der High-Density-Lipoproteine die Stabilität der im Serum zirkulierenden Protein-Lipid-Komplexe herabgesetzt ist und diese dem Angriff phagocytierender Zellen bevorzugt ausgesetzt sind.

Das von NORUM und GJONE (141-143) beschriebene Krankheitsbild des hereditären Mangel der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase geht mit einer sehr stark erniedrigten High-Density-Lipoproteinkonzentration im Serum einher. Der Befund, daß umgekehrt auch bei der hereditären Hyp-Alpha-Lipoproteinämie eine Verminderung der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase-Aktivität im Serum auftritt, zeigt, daß diese beiden erheblichen Stoffwechselkrankheiten trotz Unterschieden in der klinischen Symptomatik näher miteinander verwandt sind, als bisher angenommen wurde.

F. Zusammenfassung

- 1) ^{32}P - ^3H -markiertes Lecithin wurde auf dem Weg der Biosynthese aus keimenden Sojabohnen gewonnen und der Abbau dieses Lecithins in Humanserum während der Inkubation bei 37° verfolgt.
- 2) Mit Hilfe einer Dünnschichtchromatographie in zwei Stufen, die die Auftrennung von Lecithin, Lysolecithin, freien Fettsäuren und Cholesterinestern ermöglicht, konnten die in jedem Reaktionsansatz ablaufenden Abbaureaktionen quantitativ im Rahmen einer Fettsäurebilanz erfaßt werden.
- 3) Während der ersten 12 Stunden der Inkubation war das Enzym Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) für über 90 % des Gesamtabbaus von markiertem Lecithin in Nüchternserum verantwortlich. Der restliche Abbau erfolgte durch Spontanhydrolyse und eine hitzestabile Pankreasphospholipase.
- 4) Die Abbaurate des markierten Sojabohnenlecithins verhielt sich gegenüber dem Abbau von nativem Lipoproteinlecithin in Serum wie 1:1,24. Dagegen wurde das markierte Lysolecithin aus Sojabohnen nur halb so schnell abgebaut wie das native Serumlysolecithin. Dies ist auf den stark erhöhten Anteil von ungesättigten Fettsäuren in der C 1-Position des Sojalysolecithins zurückzuführen.
- 5) Von Serum, das mit ^{32}P -Lecithin inkubiert worden war, wurde eine Flachdiskelektrophorese mit anschließender Autoradiographie durchgeführt. Da sich nur die Serumlipoproteine mit ^{32}P -Lecithin beluden, konnten sie selektiv aus dem Serumproteinspektrum autoradiographisch dargestellt werden.
- 6) Unterschiedliche autoradiographische Markierungsmuster in Ansätzen mit gehemmter bzw. ungehemmter Lecithinaseaktivität lieferten Hinweise dafür, daß die High-Density-Lipoprotein-Klasse III bevorzugtes Substrat, die HDL-Klasse II dagegen Produkt der LCAT-Reaktion ist.

- 7) Es konnte gezeigt werden, daß die LCAT auf die Änderung der elektrischen Ladung ihres Substrates mit einer Änderung der Enzymaktivität reagiert. Durch Aktivierung der körpereigenen Lipoproteinlipase und Postheparinlecithinase konnte parallel mit einer Erhöhung des Fettsäurespiegels und einer Zunahme der elektrophoretischen Wanderungsweite der High-Density-Lipoproteine eine partielle Hemmung der Acyltransferase erzielt werden.
- 8) Es wurde ein Test zur Bestimmung der Veresterungsaktivität im Serum ausgearbeitet, wobei standardisiertes Substrat aus Lipoprotein und markiertem Sojabohnenlecithin verwendet wurde. Mit diesem Test wurde die individuelle LCAT-Aktivität im Serum von 80 gesunden Blutspendern untersucht.
- 9) Die Aufschlüsselung der Testergebnisse nach Alter und Geschlecht der Probanden ergab bei Männern bis 30 Jahren eine signifikant höhere LCAT-Aktivität als bei Frauen gleichen Alters. Bei Frauen konnte eine Zunahme der Veresterungsaktivität im höheren Alter beobachtet werden.
- 10) Bei schwangeren Frauen fand sich eine gegenüber der Norm gesteigerte LCAT-Aktivität sowie eine starke Zunahme der Lysolecithinaseaktivität.
- 11) Bei krebserkrankten Frauen war die LCAT-Aktivität gegenüber der gesunden Vergleichsgruppe im Mittelwert deutlich erniedrigt.
- 12) Die Bestimmung der LCAT-Aktivität bei einer Reihe von Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen bei bekannten klinischen und chemischen Daten ergab, daß die LCAT als ein von der Leber synthetisiertes Enzym sich ähnlich wie die Serumcholinesterase verhält, von der es sich durch seine kurze Lebensdauer unterscheidet.
- 13) Die Hemmung der beschleunigten Blutkörperchensenkung nach Wärmeinkubation des Senkungsansatzes ist auf das bei der LCAT-Reaktion erzeugte Lysolecithin zurückzuführen. Eine diagnostische Bewertung, die bei der biochemischen Bestimmung der LCAT-Aktivität noch sinnvoll ist, wird beim Senkungshemm

test fragwürdig, da zusätzliche Faktoren wie die Aktivität des Lysolecithin abbauenden Enzyms, der Albumingehalt des Plasmas und die Zahl der Erythrozyten im Senkungsansatz diesen Test beeinflussen.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Sperry, W.M.: J.Biol.Chem. 111, 467. (1935)
- 2) Klein, W.: Z. Physiol. Chem 254, 1. (1938)
- 3) Le Breton, E., und J. Pantaleón: Arch. Sci. Physiol. 1, 199. (1947)
- 4) Wagner, A.: Quart. Bull. Northwestern Univ. Medical School. 33, 282. (1960)
- 5) Murphy, J.R.: J. Lab. Clin. Med. 60, 86. (1962)
- 6) Etienne, J., and J. Polonovski: Bull. Soc. Chim. Biol. 42, 857. (1960)
- 7) Glomset, J.A., F. Parker, M. Tjaden, and R.H. Williams: Biochem. Biophys. Acta. 58, 398, (1962)
- 8) Glomset, J.A.: J. Lipid Res. 9, 155. (1968)
- 9) Glomset, J.A.: Biochim. Biophys. Acta. 70, 389. (1963)
- 10) Glomset, J.A.: Biochim. Biophys. Acta. 63, 128, (1962)
- 11) Dawson, R.M.C.: Biochem. J. 64, 192, (1956)
- 12) Bergenhem B. und R. Fahraeus.: Z. ges. exp. Med.: 97, 535, (1936)
- 13) Bergenhem, B.: Acta path. microbiol. scand., Suppl. 39, 220, (1939)
- 14) Kayser, F.H., G. Nass und G. Ruhenstroth-Bauer: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 331, 95, (1963)
- 15) Ruhenstroth-Bauer, G.: Der Mechanismus der Blutsenkung. Münch. med. Wschr. 99, 813, (1957)
- 16) Adelkofer, F., W. Schiebel, E. Ancker und G. Ruhenstroth-Bauer.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 349, 417, (1968)
- 17) Adelkofer, F., H.-J. Kethnath, L. Uher und G. Ruhenstroth-Bauer.: 19, 321 (1969)
- 18) Schiebel, W., G. Nass, M. Eulitz u. G. Ruhenstroth-Bauer.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 338, 198, (1964)
- 19) Ruhenstroth-Bauer, G.: Klin.Wschr. 43, 460, (1965)
- 20) Wagner H., J. Hölzl, A. Schmid u. L. Hörhammer: Naturwissenschaften 50, 230, (1963)
- 21) Rhodes, D.N., C.H. Lea: Biochem. 65, 526, (1957)
- 22) Rouser, G., G. Kritchevsky, D. Heller, E. Lieber: J. Am. Oil Chem. Soc. 40, 425, (1963)

- 23) Zahler, P.: Z. klin.Chem. und klin.Biochem. 4, 191, (1967)
- 24) Snyder, F. und N. Stephens: Anal. Biochem: 4, 128, (1962)
- 25) Snyder, F.: Anal. Biochem. 9, 183 (1964)
- 26) Habermann, E., Bandtow, B., G. Krusche, B.: Klin. Wschr. 39, 816, (1961)
- 27) Bartlett, G.R.: J. Biol..Chem. 234, 466 (1959)
- 28) Fiske, Ch.H., Subbarow, Y.: J. Biol.Chem. 66, 375 (1925)
- 29) Duncombe, W.G.: Clin. Chim acta 9, 122 (1964)
- 30) Howorth, P.J.N., S. Gibbard and V. Marks,: Clin.Chim acta 14, 69, (1966)
- 31) De Lalla, O.F., Gofman, J.W.,: Methods Biochem.Analysis 1, 459, (1954)
- 32) Korn, E.D.: Methods Biochem Analysis 7, 145, (1959)
- 33) Lindgreen, F.T., Nichols, A.V., Putman, F.W.: Plasma Proteins, Bd. II, S.,~~W~~, Academic Press, New York (1960)
- 34) Barclay, M., Barclay, R.K. and Skipski, V.P.: Nature, 200 362, (1963)
- 35) Frederickson, D.S.: Proc nat. Acad. Sci. 64, 1133, (1969)
- 36) Barclay M., Escher, G.C., Kaufman, R.J., Terebus-Kekish, O Greene, E.M., and Skipski, V.P.: Clin Chim. Acta 10,39, (1964)
- 37) Havel, J.R., Eider, H.A., Bragdon, J.H.: J. clin.Invest 34, 1345, (1955)
- 38) Raymond, S., Miles, J.L. and Lee, J.C.J.: Science 151, 346 (1966)
- 39) Maurer, H.R.: Diskelektrophorese S. 34, Berlin (1968)
- 40) Westergren, A.,: Ergebn. inn.Med. 26, 577 (1924)
- 41) Shah, S.N., W.J. Lossow, and J.L. Chaikoff.: Biochim. Biophys. Acta. 84, 176, (1964)
- 42) Goodman, D.: Physiol. Rev. 45, 747 (1965)
- 43) Magee, W.L., J.F. Uthe: Meth. in Enzymology 14, 170, (1969)
- 44) Hanahan, D.J., M. Rodbell and L.P. Turner,: J. biol. Chemistry 206, 431, (1954)
- 45) Davidson, F.M., C. Long.: Biochem J. 69, 458 (1958)
- 46) Raz, A.: Biochim. Biophys. Acta 239, 458 (1971)
- 47) Nichols, A.V., E.L.Gong.: Biochim. Biophys. Acta 231, 175, (1971)

- 48) Ho, W.K.K., A.V. Nichols: Biochim. Biophys. Acta 231, 185, (1971)
- 49) Ahanuma, Y., J. Glomset: Biochim. Biophys. Res. Comm. 32, 4, (1968)
- 50) Schumaker V.N., G.H. Adams: Ann. Rev. Biochemistry 8, 114 (1969)
- 51) Dawson, R.M.: Metabolism and physiological Significance of Lipids, S. 179 London (1964)
- 52) Ehrly, A.M., H. Döppenschmidt und E. Böhle: Acta Haemat. 40, 205, (1968)
- 53) Vogel, W., C. and Biermann, E.L., J. Lip: Lip. Res. 46-53, 8, p. (1967)
- 54) Vogel, W.C., and L. Zieve: J. L. lipid. Res. 5, 177 (1964)
- 55) Mackenzie, R.D. und Edward M. Auxier: Biochem. Medicine 2, 413, (1969)
- 56) Greten, H. Levy R.J. und D.S. Frederickson: Biochim. Biophys. Acta 164, 185, (1968)
- 57) Glomset, J.A.: Biochim. Biophys. Acta 70, 389, (1963)
- 58) Glomset, J.A.: A.J. Clin. Nutr. 23, 1129 (1970)
- 59) Glomset, J.A., and D.M. Kaplan: Biochim. Biophys. Acta 98, 41, (1969)
- 60) Glomset, J.A. and Wright J.L.: Biochim. Biophys. Acta 89, 266 (1964)
- 61) Etienne, J., A. Gruber und J. Plonovski,: Bull. soc. chim. Biol., 49, 1751 (1967)
- 62) Hölzl, J., H. Wagner: Z. Naturforsch. 26, 425 (1971)
- 63) Doizaki, E.M., and Zieve L.: J. Lab. Clin. Med. 67,
- 64) Zieve, L., W.C. Vogel: J. Lab. Clin. Med. 57, 586, (1962)
- 65) Rüman, A., Shapiro B.: Biochem J. 71, 620 (1959)
- 66) Vogel, W.C. and Ziebe, L.: J. Clin. Invest. 39, 1295 (1960)
- 67) Van Deenen, L.L.M. and De Haas, G.H.: Biochim. Biophys. Acta 70, 538 (1963)
- 68) Uthe, J.F. and W.L. Magee: Can. J. Biochem 49, 785, (1971)
- 69) Uthe, J.F. and W.L. Magee: Can. J. Biochem 49, 776 (1971)

- 70) Ibrahim, S.A., Sanders, H. and Tompson R.H.S.: Biochem. J. 93, 588 (1964)
- 71) Adlhofer, F., W. Schiebel, E. Ancker and G. Ruhenstroth-Bauer: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 417, (1968)
- 72) Marai, L., A. Kuksis, : J. Lipid Res. 10, 141, (1969)
- 73) Höglzl, L. A.: Anal. Chem. 137, 252 (1970)
- 74) Schrade, W. et al., : Klin. Wschr. 38, 739 (1960)
- 75) Portman, W.O., Soltys, P., Alexander M., Osuga T.: J. Lip. Res. 11, 596 (1970)
- 76) Portman, W.O.: Adv. Lip Res. S, 51 (1970)
- 77) Stein, Y., and O Stein: Biochem. Biophys. Acta 144, 698 (1968)
- 78) Eisenberg, S.Y. Stein and O. Stein: Biochim. Biophys. Acta 137, 221 (1967)
- 79) Oncley, J.L. and S.E. Alerten: Vox Sanguinis 6, 201 (1966)
- 80) Glomset, J.A., E.T. Jannsen, R. Kennedy and J. Dobbins: Journal of Lipid Research, Vol. 7, 639 (1966)
- 81) Armstrong, S.H., Jr. M.J.E. Budka and K.C. Morrison: J. Am. Chem. Soc. 69, 416 (1947)
- 82) Hoch, H. and A. Chanutin: J. Biol. Chem 209, 661 (1954)
- 83) Scanu, A., Granda, J.L. Biochemistry 5, 446, (1966)
- 84) Fielding, C.J., P. E. Fielding: FEBS Letters 15, 355 (1970)
- 85) Shah, S.N., W. J. Lossow and I. L. Chaikow: Biochim. Biophys. Acta 84, 176 (1964)
- 86) Rowen, R. Biochim. Biophys. Acta 84, 761
- 87) Goodman and Shafir, : J. Am. Chem. Soc. 81, 364 (1959)
- 88) Gordon, W. : J. Clin. Invest. 34, 477 (1955)
- 89) Kunkel, P.: J. Clin Invest. 35, 641 (1956)
- 90) Keul, J., G. Haralambie, : Med. Welt 21, 39 (1970)
- 91) Deutsch, E., G. Geyer, : Laboratoriumsdiagnostik, Berlin 1969
- 92) Lipson, M.J. and S. Naimi: J. Lip. Res. 12, 294 (1971)
- 93) Degrelle-Cheymol, C.: Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol. 15, 1072 (1970)
- 94) Cavalli-Sforza, L.: Biometrie, Stuttgart (1969)

- 95) Campbell, R.C. : Statistische Methoden für Biologie und Medizin, Stuttgart (1971)
- 96) Brot, N.W., J. Lossow, and I.L. Chaikoff. : J. Lip. Res. 3, 413 (1962)
- 97) Friedmann, M. and S.O. Byers: J. Clin. Invest. 34, 1369 (1955)
- 98) Weiss, C. Diagnostische Bewertung von Laborbefunden, München (1970)
- 99) Mehnert, H., H. Förster: Stoffwechselkrankheiten S. 301, Stuttgart (1970)
- 100) Marsh, J.B. : J. Biol. Chem. 238, 1752 (1963)
- 101) Marsh, J.B. and Drabkin, D.L. Metab. Clin. Exp. 2, 946 (1960)
- 102) Marsh, J.B. and Whereat, A.F. : J. Biol. Chem. 234, 3196 (1959)
- 103) Schiebel, W., G. Ruhenstroth-Bauer : Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 27 (1967)
- 104) Huth, K., J. Kracht, W. Schönborn und W. Fuhrmann: DMW 47, 2357 (1970)
- 105) Kummer, H., J. Laissue, H. Spiess, R. Pflugshaupt, U. Bucher: Schweiz. Med. Wschr. 98, 406 (1968)
- 106) Kocen, R.S., J.K. Lloyd, P.T. Lascelles: The Lancet, 24, 1341, (1967)
- 107) Fredrickson, D.S., R.I. Levy, R.S. Lees: New Engl. J. Med. 276, 34, 94, 148 (1967)
- 108) Fredrickson, D.S. : Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 64, 1133 (1969)
- 109) Wagner, A., und C.A. Poindexter : J. Lab. Clin. Med. 40, 321 (1952)
- 110) Gherondache, C.N. : J. Clin. Endocrinol. Metab. 23, 1024 (1963)
- 111) Castro Mendoza, H. und C. Jimenez Diaz Bull. Inst. Med. Res. (Madrid) 2, 81 (1949)
- 112) Monger, E.A. and P.J. Nestel: Clin. Chim. Acta 15, 269 (1967)
- 113) Sugano, M., und O.W. Portmann: Arch. Biochem. Biophys. 109, 302 (1965)
- 114) Sugano, M. I. Chinen, und M. Wada J. Biochem. (Tokio) 58, 285, (1965)
- 115) Turner, K.B., and V. Pratt Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 71, 633 (1949)

- 116) Turner, K.B., G.H. McCormack, Jr, and A. Richards:
J.Clin. Invest. 32, 801 (1953)
- 117) Stefanovich, V. Biochem. J. 115, 560 (1969)
- 118) Kattermann, R. und D.I. Wolfrum, Z.Klin.Chem.u.
klin.Biochem. 115, 560 (1969)
- 119) Glomset, I.A. und J.L. Wright Biochim.Biophys.Acta 89,
266 (1964)
- 120) Hernandez, H.H. und I.L. Chaikoff J.Biol.Chem. 228,
447 (1957)
- 121) Deykin, D. und D.S. Goodman: J.Biol.Chem. 237, 3649 (1962)
- 122) Barclay, M., Barclay R.K., Skipsky, E. Shah: Biochem. J.
96, 205 (1965)
- 123) Delalla, O.F., Elliot, H.A. und J. W. Gofman: Biochem. J. 34
333 (1954)
- 124) Skipski V.P., M. Barclay, R.K. Barclay, V.A. Fetzer,
J.J. Good und F.M. Archibald: Biochem. J. 104, 340 (1967)
- 125) Aftergood, L. und Alfin-Slater: J.Lipid Res. 8, 126 (1967)
- 126) Aftergood, L. und Alfin-Slater: J.Lipid Res. 12, 306
(1971)
- 127) Aftergood, L. H.J. Hernandez und Alfin-Slater:
J.Lipid Res. 9, 44 (1968)
- 128) Fillios, L.C., R. Kaplan, R.S. Martin und F.J. Stare:
Am.J. Physiol. 193, 47 (1958)
- 129) Noble, N.L., R.J. Boucek: Circulation Res. 6, 573 (1957)
- 130) Raz, A., F.A. Kummerow, T. Nishida: Biochim Biophys. Acta
176, 591 (1969).
- 131) Wynn, V., J. Doar, J.W.H. Mills, Lancet 2 720 (1966)
- 132) Jipp, P.: Klin. Wschr. 49, 695 (1971)
- 133) Portman, W.O., P. Soltys, M. Alexander, R. Behrman: Biochem.
Biophys Acta 167, 610 (1968)
- 134) Biezenski, J.J., J. Carroza und J. Li: Biochim. Biophys. Ac
239, 92 (1971)
- 135) Ansell, G.B.: Adv. Lip. Res. 3, 139 (1965)
- 136) Nestel, P.J.: Adv. Lip. Res. 8, 1 (1970)

- 137) Brot, N.W., J. Lossow und I.L. Chaikoff: J.Lipid Res. 3, 413 (1962)
- 138) Friedman, M. and S.O. Byers: J.Clin. Invest. 34, 1369 (1955)
- 139) Phillips, G.B., : J.Clin. Invest. 39, 1639 (1960)
- 140) Portman, O.W., und Sugano: Arch. Biochem. Biophys. 105, 532 (1964)
- 141) Norum, K.R. und E. Gjone Biochim. Biophys. Acta 144, 698 (1967)
- 142) Gjone, E. und K.R. Norum: Acta Med. Scand. 188, 323, (1970)
- 143) Norum, K.R. und Gjone, E.: Scand. J. clin. Lab. Invest. 20, 231, (1967)
- 144) Zöllner, N.: DMW 89, 731 (1964)
- 145) McKenzie, I.F.C., und Nestel, P.J.: J.Clin. Invest. 47, 1685 (1968)
- 146) Eisenburg, J.: Fortschr. Med. 86, 848, 903 (1968)
- 147) Piukovich, I., M. Scegvari, M. Gabor und I. Lascan: Med. Welt 31, 1694 (1968)
- 148) Alpern, D.E.: 8. Int. Cancer Congress Vol. XX, 1623 (1964)
- 149) Ruhenstroth-Bauer, G.: Münch. Med. Wschr. 99, 813 (1957)
- 150) Gross, R.W. Gerhard und G. Rassner: Dtsche med. Wschr. 91, 1869 (1966)
- 151) Piper, W., Obladen, M. Zöllner: DMW 94, 605 (1969)
- 152) Meyer-Burg, J., H. Henning: DMW 94, 863 (1969)
- 153) Sarembe, B.: DMW 94, 504 (1969)
- 154) Adam, W., S. Laur: Ärztl. Forsch. 22, 293 (1968)
- 155) Fredrickson, D.S., P.H. Atrocchi, L.V. Avioli, D.S. Goodman, H.C. Goodman: Ann. intern. Med. 55, 1016 (1961)
- 156) Barclay, M., Calathes, D.N., Di Lorenzo, J.C., J.C. Helper und R.J. Kaufman: Cancer 12, 1163 (1959)
- 157) Barclay, M., V.P. Skipski, O. Terebus-Kekish, E.M. Greene, R.J. Kaufman und C.C. Stock : Cancer Res. 30, 2420, (1970)

Lebenslauf

30. August 1943 geboren in Anzenbach/Berchtesgaden
Eltern: Karl Scherer, Kaufmann
Claire Scherer, geb. Dysli
Hausfrau
Konfession : römisch katholisch

Sept. 1949 - Juli 1954 Volksschule in Landshut/Ndb.

Sept. 1954 - Feb. 1959 Oberrealschule in Landshut

Feb. 1959 - Juli 1963 Maria-Theresia-Oberrealschule
in München, Abitur.

Okt. 1963 - Sept. 1965 Wehrdienst bei der Bundeswehr

Nov. 1965 - Aug. 1966 Studium der Germanistik, Romanistik
und Völkerkunde an der Universität
München

Nov. 1966 Beginn des Studiums der Human-
medizin an der Universität München

März 1969 Physikum

April 1970 Aufnahme in die Studienstiftung
des deutschen Volkes

Juni 1972 medizinisches Staatsexamen

Sept. 1969 - Feb. 1972 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut
für Biochemie in München

Den Patienten und Ärzten der Münchner Universitätskliniken sowie den Mitarbeitern der Blutbank Dr. Rasch, München, die die Arbeit in der vorliegenden Form ermöglichten, danke ich für ihre Unterstützung.

Frau Jane Langley danke ich für die ausgezeichnete technische Assistenz.

